

AU

Surface cross-linked particles suitable for controlled delivery

Patent number: JP2001514316T

Publication date: 2001-09-11

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: A61K9/51; C08B15/00; C08L1/28; C08L5/04; C08L89/06; A61K9/51; C08B15/00; C08L1/00; C08L5/00; C08L89/00;
(IPC1-7): C08G69/48; A61K9/52; C08B15/10; C08J3/12; C08J3/24; C08L1/28; C08L5/04; C08L77/04; C08L89/06

- european: A61K9/51; C08B15/00B; C08L1/28F; C08L5/04; C08L89/06

Application number: JP20000508731T 19980828

Priority number(s): AU1997PO08880 19970829; WO1998IB01464 19980828

BEST AVAILABLE COPY

Also published
as:

WO9911703 (A1)

EP1012208 (A1)

US6221397 (B1)

CA2302523 (A1)

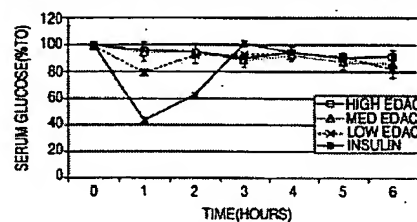
Report a data error here

Abstract not available for JP2001514316T

Abstract of corresponding document: US6221397

Cross-linked particles are provided that are useful for delivery of pharmaceutical agents. The particles comprise at least one polymeric compound and a spacer compound, where the polymeric compound and the spacer each comprise reactive carboxyl, hydrazidyl, amino and/or thiol groups. The particles are cross-linked via covalent linkage of the reactive groups on the polymer and spacer respectively. Compositions comprising pharmaceutical agents contained within the particles are disclosed. Methods for preparing the particles, for encapsulating pharmaceutical agents within the particles, and for using the particles for controlled release of the pharmaceutical agent within the patient also are provided.

MODIFICATION OF SERUM GLUCOSE WITH PEC NANOPARTICLES



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-514316

(P2001-514316A)

(43) 公表日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 8 G 69/48		C 0 8 G 69/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/52		A 6 1 K 9/52	4 C 0 9 0
C 0 8 B 15/10		C 0 8 B 15/10	4 F 0 7 0
C 0 8 J 3/12		C 0 8 J 3/12	Z 4 J 0 0 1
3/24		3/24	4 J 0 0 2

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-508731 (P2000-508731)
(86) (22) 出願日 平成10年8月28日 (1998.8.28)
(85) 翻訳文提出日 平成12年2月29日 (2000.2.29)
(86) 国際出願番号 P C T / I B 9 8 / 0 1 4 6 4
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 1 1 7 0 3
(87) 国際公開日 平成11年3月11日 (1999.3.11)
(31) 優先権主張番号 P O 8 8 8 0
(32) 優先日 平成9年8月29日 (1997.8.29)
(33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(71) 出願人 バイオテック・オーストラリア・ピーティ
ーワイ・リミテッド
オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェ
ールズ 2069、ローズヴィル、ピー・オ
ー・ボックス 20、パーカー・ストリート
28
(72) 発明者 ラッセル・ジョーンズ、グレゴリー ジョ
ン
オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェ
ールズ 2068、ミドル・コーヴ、グリーン
フィールド・アヴェニュー 23
(74) 代理人 弁理士 萩野 平 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 架橋粒子

(57) 【要約】

本発明は医薬用薬剤を送達するのに有用な架橋粒子を提供するものである。この粒子は少なくとも一つのポリマー化合物とスパーサー化合物とからなり、ポリマーとスパーサーはそれぞれ、反応性のカルボキシル、ヒドラジシル、アミノおよび/またはチオール基を備えている。ポリマーとスパーサーそれぞれの反応性基が共有結合することにより、粒子が架橋される。粒子内に含まれる医薬用薬剤からなる組成物が開示されている。粒子内に医薬用薬剤を内包させ、また、使用時に患者の体内でその粒子が医薬用薬剤を調節しながら放出するための、粒子の製造方法も開示されている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含む架橋粒子であって、ここで該ポリマーが、

(i) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基と、

(ii) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基を少なくとも二つ含有するスペーサーとが、共有結合されていることを含む、

架橋粒子。

【請求項2】 スペーサーが $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CONHNH}_2$ の化学式を有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、請求項1の架橋粒子。

【請求項3】 スペーサーが、ヒドラジン、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項2の架橋粒子。

【請求項4】 スペーサーが、マロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体であって、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれたものである、請求項1の架橋粒子。

【請求項5】 スペーサーが少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つの反応性ヒドラジジル基を含有する、請求項1の架橋粒子。

【請求項6】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性結合を含有する、請求項1の架橋粒子。

【請求項7】 該粒子が目標の化合物と共有結合している、請求項1の架橋粒子。

【請求項8】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含む架橋粒子の内部に医薬用薬剤を含有する組成物であって、ここで該ポリマーが、

(i) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基と、

(ii) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基を少なくとも二つ含有するスペーサーとが、共有結合されている、ことからなる、組成物。

【請求項9】 該スペーサーが $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CONHNH}_2$ の化学式を有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖、または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、請求項8の組成物。

【請求項10】 該スペーサーが、ヒドラジン、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドおよびブタジエン酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項9の組成物。

【請求項11】 該スペーサーが、マロン酸、マレイン酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体であって、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれたものである、請求項8の組成物。

【請求項12】 スペーサーが少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つの反応性ヒドラジジル基を含有する、請求項8の組成物。

【請求項13】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有す

る、請求項8の組成物。

【請求項14】 該生分解性の結合がエステル結合である、請求項8の組成物。

【請求項15】 該スペーサーがアミノ酸の2-アミノエチルエステルである、請求項8の組成物。

【請求項16】 該スペーサーが、グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステル、およびグリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのジスクシンイミジル誘導体からなる群より選ばれたものである、請求項15の組成物。

【請求項17】 グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのスクシンイミジル誘導体が、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-2-ベンジルエタン酸)、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-エチル-エタン酸、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)からなる群より選ばれる、請求項16の組成物。

【請求項18】 該医薬用薬剤が、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、)、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群より選ばれる、請求項8の組成物。

【請求項19】 該医薬用薬剤が、カルシトニン、エリトロポイエチン、トロポポイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)類縁体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群より選ばれる、請求項18の組成物。

【請求項20】 架橋粒子が目標の化合物に共有結合されている、請求項8の組成物。

【請求項21】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを反応させることからなる架橋粒子を製造する方法であって、該ポリマーと該スペーサーがそれぞれ、カルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよびチオール基からなる群より選ばれた少なくとも二つの反応性基を含有し、該架橋がカルボジ

イミドを架橋剤として用いることで達成されている、
方法。

【請求項22】 スペーサーが $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CONHNH}_2$ の化学式を有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、請求項21の方法。

【請求項23】 該スペーサーが、ヒドラジン、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドおよびブタジエン酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項22の方法。

【請求項24】 該スペーサーが、マロン酸、マレイン酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体である群より選ばれたものである、請求項22の方法。

【請求項25】 該スペーサーが少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つの反応性ヒドラジジル基を含有する、請求項22の方法。

【請求項26】 該カルボジイミドが、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCまたはEDACとして知られている)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N,N'-ジ-t-ブチルカルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1,3-ジ-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(β -ジエチルアミノエチル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4)-エチル)カルボジイミド、および1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミドからなる群より選ばれたものである、請求項22の方法。

【請求項27】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有す

る、請求項22の方法。

【請求項28】 該架橋粒子が目標の化合物と共有結合している、請求項22の方法。

【請求項29】 架橋粒子の内部に医薬用薬剤を含有する組成物を製造する方法であって、該架橋粒子は粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含有しており、ここで該ポリマーが、

(i) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基と、

(ii) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基を少なくとも二つ含有するスペーサーとが、共有結合されており、

該粒子が医薬用薬剤の存在下に少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを反応させて形成される、

方法。

【請求項30】 該スペーサーが $\text{NH}_2\text{NHCO}-\text{R}-\text{CONHNH}_2$ の化学式を有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、請求項29の方法。

【請求項31】 該スペーサーが、ヒドラジン、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドおよびブタジエン酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項30の方法。

【請求項32】 該スペーサーが、マロン酸、マレイン酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体であって、ここで該分岐アルキル鎖は炭素原子数が10までであるようなもの、からなる群より選ばれたものである、請求項30の方法。

【請求項33】 該スペーサーが少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つの反応性ヒドラジジル基を含有する、請求項30の方法。

【請求項34】 該ポリマーと該スペーサーとの反応が、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、NN'-ジシクロヘキシル-カルボジイミド、N'-ジイソプロピル-カルボジイミド、N'-N'-ジtert-ブチルカルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1,3-ジ-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(β -ジエチルアミノエチル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4)-エチル)カルボジイミド、および1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチル-アミノシクロヘキシル)カルボジイミドからなる群より選ばれたカルボジイミドにより触媒作用を受ける、請求項30の方法。

【請求項35】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項30の方法。

【請求項36】 該医薬用薬剤が、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群より選ばれる、請求項30の方法。

【請求項37】 該医薬用薬剤が、カルシトニン、エритроポイエチン、トロポポイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)類縁体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群より選ばれる、請求項36の方法。

【請求項38】 該架橋粒子が目標の化合物と共有結合している、請求項30の方法。

【請求項39】 患者の体内に医薬用薬剤を調節しながら放出することを目的とする方法であって、該患者に架橋粒子の内部の医薬用薬剤を含有する組成物の有効量を投与することからなり、ここで、該架橋粒子は粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含有し、該ポリマーが、

(i) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基と、

(ii) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基を少なくとも二つ含有するスペーサーとが、共有結合されていることからなる、

方法。

【請求項40】 該スペーサーが $\text{NH}_2\text{NHCO}-\text{R}-\text{CONHNH}_2$ の化学式を有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、請求項39の方法。

【請求項41】 該スペーサーが、ヒドラジン、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドおよびブタンジカルボン酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項40の方法。

【請求項42】 該スペーサーが、マロン酸、マレイン酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体からなる群より選ばれたものである、請求項40の方法。

【請求項43】 該スペーサーが少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つの反応性ヒドラジジル基を含有する、請求項40の方法。

【請求項44】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項40の方法。

【請求項45】 該医薬用薬剤が、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群より選ばれる、請求項40の方法。

【請求項46】 該医薬用薬剤が、カルシトニン、エритроポイエチン、トロンボポイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）類縁体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群より選ばれる、請求項45の方法。

【請求項47】 該架橋粒子が目標の化合物と結合している、請求項40の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は医薬品の送達に有用な架橋粒子に関するものである。特に、本発明は該粒子を安定化させ、脊椎動物の体内での取り込みと医薬用薬剤の放出を調節する改良された方法に関する。

【0002】

発明の背景

活性部位に医薬用薬剤を有効に送達し、医薬用薬剤を適切な速度で放出せしめることは、薬学的治療の開発と改善の面で、永年の課題であった。特に、治療用薬剤をうまく投与しようとする、脊椎動物の胃腸管の場合には、物理的・化学的に多くの障壁が存在することはよく知られている。たとえば、治療用の薬剤は、体内の酵素類、胃における酸性、腸におけるアルカリ性に耐えて活性を維持しなければならない、しかも、胃腸の粘膜の中に浸透して血流中に入り、活性が要求されている部位に到達せねばならない。その上、これらの事がすべて適切な速度で起こり、治療薬が正しく送達されねばならないのである。

【0003】

従来から、これらの問題を解決するために多くの試みがなされてきた。たとえば、活性な薬剤を特別大量に投与すれば、少なくともながしきの薬剤は分解されずに目的の活性部位に到達せしめ得るという点では有効であるとも言える。この方法は腸溶性の薬剤の投与の場合には明らかに問題があり、不経済でもある。ある場合には、加圧錠や腸溶コーティングのような単純で機械的な手段の方が、対象の薬剤の腸での耐性を改善し、薬物の放出を調整するためには、適していることもあろう。最近では、リポソームや脂質のマイクロバブルを開発して活性な薬剤をカプセル化できるようにする研究もかなり進んでいる。しかし、これらの方法は、いかなる場合にも有効であるというわけではない。

【0004】

医薬用薬剤を保護しその放出速度を調節するために、薬剤をマイクロ粒子やナノ粒子でカプセル化することは米国特許第5,352,461号に記載されている

。この特許は、2, 5-ジケト-3, 6-ジ(4-スクシニルアミノブチル)ピペラジンから形成した自己会合性粒子によるドラッグ・デリバリー・システムに関するもので、これはpHに敏感なために、pHが高くなるとばらばらにほぐれて内包していた医薬用薬剤を放出すると主張されている。インスリンやヘパリンのような薬剤を内包して、これらの分子を胃での酸性や胃腸内の酵素から保護し、薬剤を血液内に放出することができるとされる他の粒子類が、国際特許公報第WO 88/01213号において提案されている。ビスアミドジカルボン酸の自己会合性を利用した、pH滴定可能な自己会合性粒子については、Bergeronらによる研究に述べられている(J. Amer. Chem. Soc., 1995, 117, 6658-6665)。

。これらの粒子も、低pH域での安定性とpHが高くなるにつれて不安定になるという性質を持っている。

【0005】

国際特許公報第WO 96/29991号では、ポリアミノ酸、さらに詳しくはポリロイシングルタメートを用いた自己会合性粒子の製造が述べられている。天然アミノ酸から製造したこれらの粒子は、粒子サイズが調節でき、広いpH範囲で安定である。

【0006】

医薬用薬剤、特にペプチドやタンパク質を内包させるための粒子は、種々のアニオン性ポリマーとカチオン性ポリマーを高分子電解質錯形成反応させることによって作ることができる。アニオン性ポリマーとしては、各種のものがあるが、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、グアラン、ポリグルタミン酸やそれらの誘導体など天然由来物がある。カチオン性ポリマーの例をあげれば、ポリリシンやゼラチンがある。これ以外のポリカチオンやポリアニオンは、欧州特許第671169号、米国特許第4,835,248号、米国特許第5,041,291号などに詳しく述べられており、そっくりそのまま参考のためにここに採用できる。

【0007】

残念なことに、従来技術では医薬品の送達のための粒子の有効性に限度がある。それというのも、これらの粒子は多くの場合、非経口投与や経腸的投与では内

包した医薬用薬剤を早く放出しすぎることが判っている。そのため、グルタルアルデヒドを架橋剤に使用して、安定化されたマイクロ粒子を開発しようという努力が続けられてきた。しかしながらこの架橋方法では、内包された医薬用薬剤が変質を受けることがあるという難点があり、これが好ましくないことは明らかである。さらに困ったことには、この架橋反応はアルカリ性の条件下で実施するのが好ましいのだが、その条件は、多くの pH に敏感な粒子が内包している医薬用薬剤を速やかに放出する条件と一致しているのである。

【0008】

したがって、pH に敏感な粒子に使用するのに適した粒子安定化の実際的な方法で、その際に内包する医薬用薬剤をほとんどあるいは全然変質させないような方法が、切実に求められているのは明らかである。とりわけ、医薬用薬剤の送達に使用可能な方法が大いに期待されている。

【0009】

発明の開示

したがって、本発明の目的は、内包している医薬用薬剤の変質を抑制あるいは抑止する粒子安定化の実際的な方法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、内包している医薬用薬剤の変質を抑制あるいは抑止した医薬用薬剤の送達方法を提供することである。

【0010】

上記の目的を達成するために、本発明の一つの側面では、以下の成分を使用して調製できる架橋粒子が提供される。

その成分とは、

a) 粒子を形成しうる、いずれも、活性なカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有する一種以上のポリマー、および

b) 二つ以上のカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有するスペーサー、で

ここで、架橋はポリマー（類）とスペーサーのカルボキシル基と、ヒドラジジル、アミノおよびまたはチオール基の間のカルボジイミド結合により達成されるものである。

【0011】

本発明の他の実施態様によれば、架橋粒子内部に内包された医薬用薬剤を含む組成物を提供することであり、ここで架橋粒子は、

- a) 粒子を形成しうる、いずれも、活性なカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有する一種以上のポリマー、および
- b) 二つ以上のカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有するスペーサー、を含み、

ここで、架橋は医薬用薬剤の存在下で実施され、ポリマー（類）とスペーサーのカルボキシル基と、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基の間のカルボジイミド結合により触媒作用をうける。

【0012】

本発明のさらに他の実施態様によれば、適切な条件下で以下のものを反応させることを含む架橋粒子の製造方法を提供することである。それらの成分は、

- a) 粒子を形成しうる、いずれも、活性なカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有する一種以上のポリマー、および
- b) 二つ以上のカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有するスペーサー、であり、

ここで、架橋はポリマー（類）とスペーサーのカルボキシル基と、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基の間のカルボジイミド結合により達成されるものである。

【0013】

本発明の別の実施態様によれば、架橋粒子を一つ以上の医薬用薬剤に反応させることを含む一つ以上の医薬用薬剤を含む組成物の製造方法を提供するものであり、該粒子は、

- a) 粒子を形成しうる、いずれも、活性なカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有する一種以上のポリマー、および
- b) 二つ以上のカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有するスペーサー、よりなり、

ここで、架橋はポリマー（類）とスペーサーのカルボキシル基と、ヒドラジジル

、アミノおよびまたはチオール基の間のカルボジイミド結合により達成される。

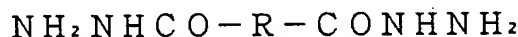
【0014】

本発明のさらに別の実施態様によれば、患者の体内で医薬用薬剤を調節しながら放出する方法を提供するもので、該患者に架橋粒子に内包された医薬用薬剤を含有する組成物の有効量を投与することを含み、ここで、該粒子は

- a) 内包性の粒子を形成しうる、いずれも、活性なカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有する一種以上のポリマー、および
- b) 二つ以上のカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよび／またはチオール基を含有するスペーサー、を含有している。

【0015】

これら実施態様において、スペーサーとしては化学式が



であるものが好ましい。ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである。また、スペーサーを以下の化合物からなる群より選んでも良い。すなわち、ヒドラジン、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群である。

【0016】

さらなる実施態様において、スペーサーを以下の化合物からなる群より選んでも良い。すなわち、マロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸、およびそれらの分岐アルキル誘導体で、該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群である。

【0017】

さらに別の実施態様においては、スペーサーは少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つの反応性ヒドラジジル基を含有する。また、スペーサーに少なくとも一つの生分解性の結合を含んでいてもよい。生分解性の結合としてはエステル結合でもよく、たとえば、スペーサーがアミノ酸の2-アミノエチルエステルの場合である。好ましい実施態様としては、スペーサーがグリシンまたはフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルか、またはそれらのスクシンイミジル誘導体の場合である。グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのジスクシンイミジル誘導体をN, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-2-ベンジルエタン酸)、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-エチル-エタン酸、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)からなる群より選ぶのも好ましい実施態様である。

【0018】

架橋粒子は目標の化合物と共有結合していてもよい。他の実施態様においては、医薬用薬剤は以下のものからなる群より選ばれる。すなわち、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、)、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群である。より好ましい実施態様では、医薬用薬剤は次の群より選ばれる。すなわち、カルシトニン、エリトロポイエチン、トロポポイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)類縁体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群である。

【0019】

本発明におけるこの他の目的、特徴、長所などは以下の詳細な記述において明らかになるであろう。しかしながら、発明の好ましい実施態様を示すための詳細な記述や特定の実施例は、単に説明を目的とするだけのものである。この詳細な説明により、本発明の精神および範囲の中で種々の変更・改善を加えることは、熟練当業者には明らかなところであるからである。

【0020】

発明の詳細な説明

不安定であること、取り込みが不十分であること、または放出速度が不適切であることにより、効能が失われる恐れのある薬剤を送達するのに有用である架橋結合粒子が提供される。特に、本発明によって包含される薬剤としては、タンパク質分解減成が生じるかまたは胃および小腸内では不安定であるペプチドおよびタンパク質薬品が含まれる。

【0021】

一般に、治療薬を投与する好適な方法は、腸を介するもの、特に経口ルートによるものである。この方法は投与が容易であり、このため患者の容認度も高い。しかし、現在、経口ルートを介して効果的に送達することができない治療薬は多い。このような薬剤の例としては、ペプチドおよびタンパク質薬品があり、これらには、カルシトニン、エリトロポイエチン、トロンプオイエチン、無顆粒球コロニー刺激因子、幹細胞因子、LHRHアナログ、ソマトスタチン、インシュリン、インターフェロン、プラスミノゲン活性阻害剤、組換え抗体、およびモノクローナル抗体が含まれる。本発明においては、用語「薬剤」はいかなる意味においてもペプチドおよびタンパク質薬品に限定されるものではなく、本発明の架橋結合粒子を用いることによって送達が支援され得るすべての治療薬、予防薬または診断薬を含む。例えば、DNAおよびRNA（センスまたはアンチセンス）種、抗体、ワクチン、ならびにもっと伝統的な化学療法薬の送達が想定される。従って、用語「薬剤」は、単純な有機または無機化合物、栄養剤、および金属、放射性同位体、放射線不透過性または放射線透過性薬剤などの造影剤を包含するものとする。「伝統的な」化学療法薬の例としては、ホルモン、ヘパリンなどの多糖類、抗体、抗炎症性化合物、抗ウイルス、欠陥作用剤、神経刺激剤、抗凝固剤、免疫調節剤、細胞毒性剤、ステロイド、鬱血除去剤、麻酔薬、鎮静剤、および他の治療、予防または診断のために患者に送達する必要のある薬剤が含まれる。上記に列挙した薬剤種類はすべてを網羅するものではない。

【0022】

さらに、本発明の薬剤はさまざまな形態で、例えば、電荷または非電荷分子として、分子錯体の成分として、塩、アミン、エーテル、エステル、またはアミド

類として、もしくは問題の薬剤の他の誘導体または前薬剤として存在することができる。

【0023】

本発明は薬剤の腸内送達に制限されない。例えば、薬剤の非経口送達の場合もまた、標的器官または標的部位に達するために薬剤が体内の関門（胃腸粘膜以外）を貫通しなければならないときなどに、本発明の利点が得られる。このような障害物の1つの例としては、血液脳関門がある。さらに、薬剤を、特定の活性部位に送達しそこに保持することもできる。

【0024】

本発明においては、用語「架橋結合」は、粒子を含むポリマー内および／またはポリマー間に共有化学結合が導入されることを示す。この架橋結合により、粒子の安定性が高まり、これにより内部に捕捉された薬剤がより良好に保護され、また薬剤放出のタイミングおよび速度に対して行い得る制御レベルが向上する。

【0025】

本発明の架橋結合技法は、既知のまたは将来考案されるかもしれないすべての粒子タイプに対しても、その粒子のポリマー成分が反応性カルボキシル基、ヒドラジル基、アミノ基および／またはチオール基を含むか、または含むように改変することができるならば、適用することができる。本明細書においては、用語「反応性」とは、これらの基が好ましくは粒子の外表面に存在し、他の官能基によって妨害されず、よって本発明によって包含される架橋結合反応が生じることが可能となることを示す。

【0026】

また、用語「粒子」は、その立体形状または配座に関係なく、薬剤を送達するすべての粒子を包含する。本発明の粒子は、薬剤を完全にまたは部分的に包容するか、または薬剤を粒子のポリマーマトリックス内に捕捉するものであるとよい。既に微粒子またはナノ粒子として分類されている粒子がこの定義の範囲に含まれる。よって、平均粒径は約10nmから900 μ mの間であるのがよい。例えば、薬剤の制御放出のために体内の特定の領域に配置される移植片として働くように意図された粒子は、平均粒径が400～800 μ mであるのが適切である。

一方、細胞による内面化(internalisation)、または胃腸粘膜を通る輸送を必要とする粒子は約 $10\mu\text{m}$ より小さい平均粒径がよい。これに対して、皮下投与される粒子は、粒子が全身循環に再侵入するのを防ぐために平均粒径が $10\mu\text{m}$ より大きいのが適切である。

【0027】

使用される粒子の形状および立体配座は、その粒子の意図された用途に依存する。詳しくは、粒子形状または配座は、送達される薬剤の立体形状すなわち配座についての知識に基づいて選択するのがよい。

【0028】

以下の文献は、本発明に関連して使用することができるか、または使用するように改変することができる様々なタイプの粒子について述べている。これらの文献は全体が本明細書において参考として援用される。文献およびこれらに開示される粒子タイプについての以下の列挙はすべてを網羅するものではない。米国特許第5,352,461号、国際特許公開W088/01213、Bergeronら、J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 6658-6665、国際特許公開W096/29991、欧州特許第6712169号、ならびに米国特許第4,835,248号および第5,041,291号。

【0029】

一般的に、薬剤送達用粒子は多くの方法により形成することができる。それらのいくつかを以下に概略的に示す。これらは、いかなる意味においても本発明の意図された範囲を制限するものではない。

【0030】

(i) 溶剤蒸発

この技法では、ある溶剤に溶解している化合物を非混和性溶剤中に分散させ、第1の溶剤を蒸発により除去する。この方法で形成される粒子は、多くの水に不溶の化合物を非経口投与するために使用されている。このような系の例としては、抗菌剤であるグリセオフルビン(Griseofulvin)を内部に捕捉するポリ乳酸-グリコール酸ナノ粒子の形成が挙げられる。

【0031】

(ii) 脱溶解 (Desolvation)

この方法では、化合物を第1の液体（溶剤）に溶解させて、この溶剤に第2の液体（第1の液体に混和するが、この化合物は溶解しない）を加える。第2の液体の添加量が多くなるに従って、化合物は脱溶解される。脱溶解プロセス中、化合物富有相（コアセルベート）は、化合物不足相中の微小滴として分散している富有量の化合物を含む。この段階で、この合体材料を適切な架橋結合剤によって科学的に架橋結合させ、微粒子またはナノ粒子を形成することができる。このようにしてゼラチンまたはBSAのナノ粒子を調製することができる。これらタンパク質の溶液を硫酸ナトリウムまたは硫酸アンモニウム溶液を添加することによって脱溶解させる。脱溶解の時点で濁度が増加する。この時点で、グルタルアルデヒドまたはブタンジオン(butanedione)などの適切な架橋結合剤を添加することによって、ナノ粒子を形成することができる。

【0032】

(iii) 複合コアセルベーション

この方法では、反対の電荷を有する2つの高分子電解質を水様媒体中で混合して、自発的な液体／液体相分離を生じさせる。この現象は、適切なイオン電荷密度および鎖長を有するポリマーに限定される。典型的には、これらのミクロスフェアは、ポリグルタミン酸、カルボキシメチルセルロース、アラビアゴム、アルギナート、またはポリリン酸塩などのポリアニオンを、ゼラチンまたはポリリシンなどのポリカチオンに添加することによって形成される。

【0033】

(iv) ポリマー／ポリマー不相溶性

この方法は、共通の溶剤に溶解した2つの化学的に異なるポリマーが通常は不相溶であるという観察に基づく。従って、この混合物は2つの相を形成する傾向にある。不溶相を用いてコア粒子をコートしてマイクロカプセルを形成する。1つの例は、ポリエチレンを添加することによってシクロヘキサンからエチレンセルロースを沈殿させることであろう。

【0034】

(v) 界面重合化

この技法では、それぞれが相互に不混和の液体に溶解した2つの反応物が、こ

れら2つの液体間の界面に分散し、ここで反応してカプセル壁を形成する。このようなカプセル形成の例は、油相中に溶解した塩化セバコイル (Sebacoyl) の混合物をエチレンジアミンを含有する水様相中に乳化させる場合に生じると考えられる。

【0035】

上記の記載から分かるように、様々な異なる種類のポリマーから、薬剤送達に使用することができる粒子を形成することができる。

【0036】

本発明の粒子を架橋結合させるプロセスは、粒子を形成する1つのポリマーまたは複数のポリマーのカルボキシル基、ヒドラジジル基、アミノ基、および/またはチオール基を、2つ以上のカルボキシル基、ヒドラジジル基、アミノ基、および/またはチオール基を含むスペーサを用いて反応させることによって行われる。この反応は典型的には少なくとも1つのカルボジイミドの存在によって引き起こされる。好適な架橋結合反応としては、ヒドラジドとカルボキシル基との間のヒドラジドボンドの生成、アミンとカルボキシル基との間のアミドの生成、カルボキシル基とチオール基との間のチオエステルの生成、および2つのチオール基間のジスルフィドの生成が挙げられる。選択された粒子系の1つまたは複数のポリマーが反応性カルボキシル基、ヒドラジジル基、アミノ基、および/またはチオール基を含まない場合は、これを行うように化学的に改変する必要があることは当業者であれば明瞭に理解されよう。典型的な反応では、カルボキシル基を含有するポリマーを、そのポリマーをジヒドラジジルスぺーサおよび適切なカルボジイミドと反応させることによって、ヒドラジジル基に置換させることができる(実施例7および8、ならびにRussell-Jonesら、Bioconjugate Chemistry, 6, 459-465参照)。

【0037】

本発明で使用するのに適したポリマーとしては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、およびポリリシンなどのポリアミノ酸；ポリ(N-アシルヒドロキシプロピンエステル；ポリセバシン酸、ポリフマル酸；ポリ乳酸；ポリグリコール酸；ポリ乳酸-c o -グリ

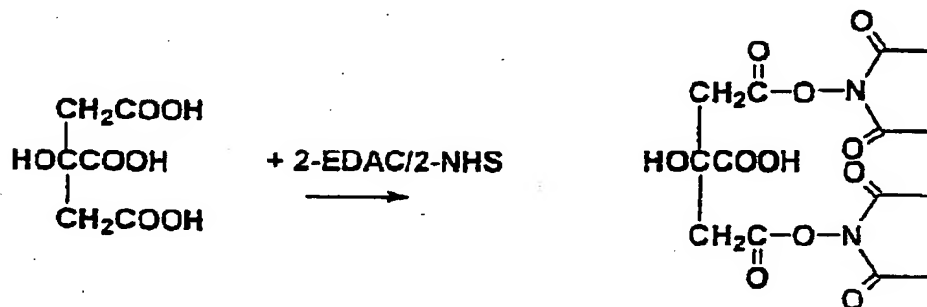
コール酸；カルボキシメチルセルロース；アラビアゴム；アルギナート；ポリリン酸塩；ヘパリン；ゼラチン；セバシン酸とフマル酸とのコポリマー；ビスカルボキシフェノキシプロパンとセバシン酸とのコポリマー；ポリカルボキシフェノキシ酢酸；ポリカルボキシフェノキシ吉草酸；ポリ-ε-カプロラクトンおよび関連ポリマー（ポリ-ε-カプロラクトン-co-δ-バレロラクトン、ポリ-ε-カプロラクトン-co-DL-乳酸）；ヒアルロン酸；キチン；キトサン；デキストラン；カルボキシ-デキストラン；コラーゲン；アルブミン；フィブリノゲン；および他の天然に生じるポリマー。

図式1は、本発明によって想定される反応図式の例を示す。この図式では、先ずトリカルボン酸、クエン酸が2倍モル超過のEDACおよびNHSと反応する。得られるジスクシニミジルエステルをアジピルヒドラジド改変ポリマーと反応させて、共有架橋結合ポリマーを形成する（実施例8参照）。

【0038】

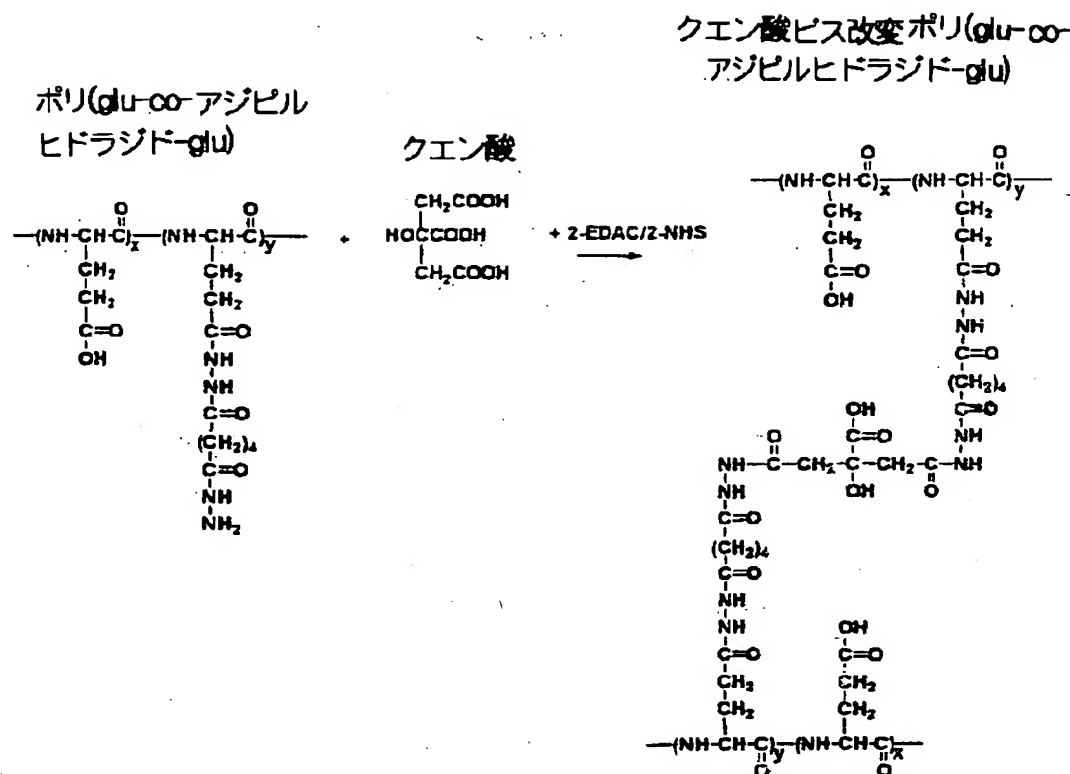
【化1】

図式1



【0039】

【化2】



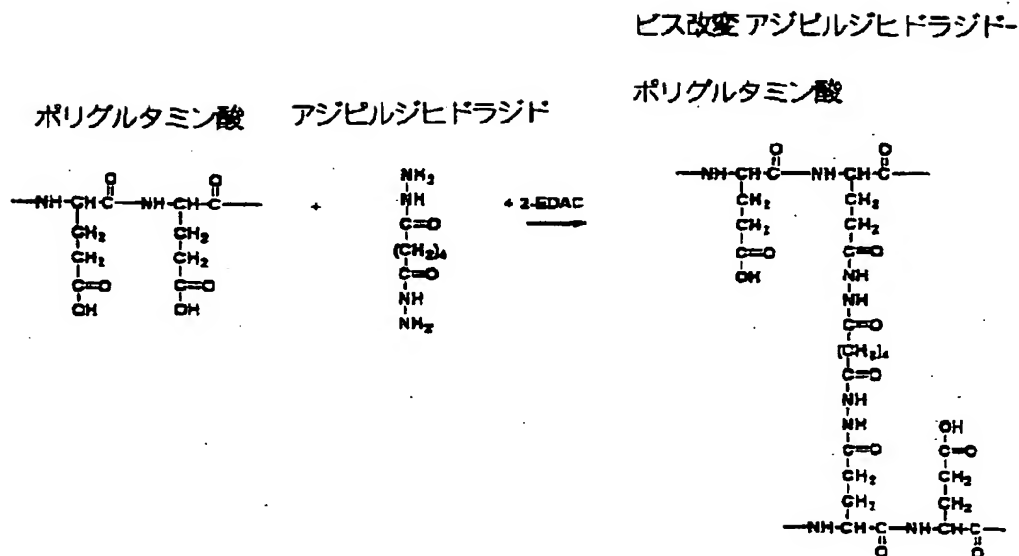
【0040】

以下の図式2は、本発明によって想定される一般的な反応図式の別の例を示す。図式2では、ポリマーのカルボン酸が、1/2モル等量のアジビルジヒドラジドの存在下でEDACと反応して、共有架橋結合ポリマーを形成する（実施例3参照）。

【0041】

【化3】

図式2



【0042】

本発明によれば、本発明で用いることができるカルボジイミドのタイプには特別な制約はないが、いくつかの特に好適なカルボジイミドとして以下のものが挙げられる。N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDCまたはEDACとして知られる)、N,N'-ジシクロヘキシル-カルボジイミド(DCC)、N'-ジイソプロピル-カルボジイミド、N,N'-ジ-tert-ブチルカルボジイミド1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1,3-ジ-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(ジエチルアミノエチル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチル-アミノシクロヘキシル)カルボジイミド (Sheehanら、J. Org. Chem. 21, 439-441 (1956))。実際において、活性エステルを生成する任意の「カップリング剤」、例えば、BOP、PyBOP、TSTU、HBTU、TBTU、HBPyU、DPPA、IIDQ、EEDQを用いることができる。これらのカップリング剤はペプチド合成の分野では周知である。

【0043】

本発明によって想定されるジヒドラジドスペーサは、以下の一般式 I によるものを含むが、これらに限定されない。



ここでRは直接ボンド、もしくは直鎖、側鎖または環状アルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基を表す。Rは好ましくは10個までの炭素原子を含む。

【0044】

好適なジヒドラジドは以下のものから選択されるが、これらに限定されない。シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、ノルボルネン(norbornene)ジヒドラジド、フタル酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジド、またはブタジエン酸(butadienoic)ジヒドラジド。またジヒドラジンをを用いてもよい。

【0045】

本発明により利用することができるカルボン酸スペーサとしては以下のものがある。マロン酸、マレイン酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、テレフタル酸、およびこれらの側鎖アルキル誘導体。

【0046】

スペーサはまた、2つ以上のカルボキシル基、ヒドラジジル基、アミノ基、および/またはチオール基を含むことが可能であり、さらには、カルボキシル基、ヒドラジジル基、アミノ基、および/またはチオール基の組み合わせでもよい。これはポリマー上に存在する反応基の性質に依存する。すなわち、ポリマー上にカルボキシル反応基のみが存在する場合は、ヒドラジジル反応基、アミノ反応基、またはチオール反応基を含むスペーサを用いるとよい。これは他の反応基の場合も成り立つ。ポリマーが例えばカルボキシル基とヒドラジジル基の両方を含む場合は、スペーサもまたこれら反応基の両方を含むのが適切であろう。

【0047】

一般に、架橋結合反応を行う場合に用いなければならない条件は、単に、必要とされる架橋結合レベルに依存して、ほぼモル等量のスペーサおよびカルボジイミドを提供することである。次に約2～24時間、好ましくは少なくとも4時間反応させて、架橋結合を進行させ終了させる必要がある。蒸留水またはPBS、塩水、ヘプスなどの他の適切な緩衝液に対して透析を行うことによって、架橋結合したカプセル状の粒子を取り出すことができる。

【0048】

薬剤は、好ましくは粒子を生成するのに必要な成分の混合物内に薬剤を含めることによって、粒子形成時に粒子内に組み込むことができる。もしくは、高分子電解質錯化を介してナノ粒子を形成する場合などでは、薬剤を、その溶解度に依存してポリカチオンまたはポリアニオン相のいずれかに混入させて、その混合物を徐々に沈殿相に添加することができる（実施例1および2を参照）。

【0049】

本発明の好適な実施形態では、スペーサは、特定の環境下で制御しながら減成させることができる生物分解性リンケージを含む。例えば、所定の環境下で切断されるリンケージユニットをスペーサに取り込んで、これにより、その生物分解性リンケージが、粒子がその捕捉している薬剤を放出できるように切断されるようにすることが可能である。これらの生物分解性リンケージは、特に所望の環境下でリンケージの切断が可能となるように仕向けることができる。いくつかの生物分解性リンケージの例としては、所定の条件下で切断可能なジスルフィドボンド、アゾ基およびエステルが挙げられる。適切なチオール切断リンカーとしては、シスタミン、シスチン、および酸化グルタチオンがある。後者の2つはNHSおよびカルボジイミドにより活性化され、ヒドラジジル基を架橋結合するために用いることができる。ペンダントヒドラジジル基と直接反応し得る他のチオール切断可能架橋結合剤としては、とりわけ、ビスー[β -(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド、ジチオビスー(スクシニミジルプロピオネート)、ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオニミデート、3,3'-ジチオビス(スルホスクシニミジルプロピオネート)、スルホスクシニミジル2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート、N

ースクシニミジル6- (4'-アジド-2'-ニトロフェニル-アミノ) ヘキサノエート、およびスルホスクシニミジル-2- (p-アジド-サリチルアミド) エチル-1, 3-ジチオ-プロピオネートが挙げられる。

【0050】

適切なエステラーゼ切断可能リンケージとしては、グリシンの2-アミノエチルエステル、フェニルアラニンの2-アミノエチルエステルを含む既知のアミノ酸の2-アミノエチルエステル、およびN,N'-ジスクシニミジル- (2-アミノ-2-ベンジル-エタノエート、N,N'-ジスクシニミジル-2-アミノ-エチル-エタノエート、およびエチレングリコールビス [スクシニミジルスクシネート] を含むこれらのジスクシニミジル誘導体から形成されるものが挙げられる。

【0051】

本発明の別の実施形態によれば、本発明の架橋結合粒子を、アクティブに胃腸粘膜を通して吸収されるかまたは腸上皮細胞に結合される化合物（以後「標的化合物」と呼ぶ）にリンクさせることが可能である。例えば、本発明の粒子をビタミンB₁₂またはそのアナログにリンクさせることができ、これが粒子を内因子（IF）に結合させて、これにより錯体が腸からアクティブに取り込まれることが可能になる。このような標的化合物の使用については、WO87/02251、PCT/AU94/00273、およびPCT/AU94/00274に記載されている。これらの文献は本明細書においてその全体が参考として援用されている。

【0052】

本発明の粒子はまた、通常バクテリアおよびウィルスの表面に存在した腸上皮に特異的に結合し得るウィルス付着因子、バクテリアの繊毛、毒性結合サブユニット、血球凝集素、レクチンまたはバクテリアインベージンにリンクさせることができる。従って、これらの原因物質に結合することによって、腸上皮を標的とする（薬剤の腸内通過を遅らせる）ことができるか、または、標的分子および付着薬剤の腸上皮細胞壁を通しての取り込みおよびトランスサイトーシスを誘引することができる。

【0053】

バクテリア付着因子のいくつかの例としては、I g A結合タンパク質 (A R P 2、A R P 4、b a c ; Fischetti, ASM News, 62, 405-410 (1996))、グループB連鎖球菌からのI g A結合タンパク質 (Russell-Jonesら、1984) ; i b c 抗原への特別な関連を有するグループB連鎖球菌のタンパク質抗原、Russell-Jonesら、J. Exp. Med., 160, 1476-1484 (1984) ; フィブリノゲン結合タンパク質 (M r p 4、S f b、P r t F、f n b A、F n B P、F n B P ; Fischetti, 1996上掲) などの様々なStreptococcal種から単離されるタンパク質、ならびにS.aureusからのコラーゲン結合因子 (c n a) および凝集因子 (c l f A) が挙げられる。

バクテリアの上皮表面への付着を担当することが示されている他の構造体としては、繊維表面付着因子または繊毛がある。これらの付着因子としては、K 8 8、K 9 9 (Mouricoutら、Infect. Immun., 58, 98-106 (1990))、新生子牛および子豚に生息するE.coli上に見られるF 4 1および9 8 7 P繊毛、ヒトに下痢を生じさせるE.coli株上に見られるC F A IおよびC F A I I繊毛、ならびにPseudomonas aeruginosap A K繊毛 (Irvinら、Infect. Immun., 57, 3720-3726 (1989) ; Doigら、Infect. Immun., 58, 124-130 (1990)) が挙げられる。また、ヒト腎盂腎炎に関連するE.coli株から単離されるタイプ「P」繊毛がある (Isberg、Science, 252, 934-938 (1991))。A.viscosusおよびA.naeslundii上にそれぞれ見られるタイプ1およびタイプ2フィムブリエもまた、これらバクテリアの付着およびこれに続く内面化に潜在的な役割を果たす。同様に、N.gonorrhoeaeの表面の36 k D aタンパク質が、これら有機体のヒト上皮細胞の表面ラクロシルセラミドへの結合に関係しており、上皮細胞によるこれらの有機体の取り込みを担当しているかもしれない (Paruchuriら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 333-337 (1990))。

【0054】

多くのバクテリアが、バクテリアインベージンとして知られる、これらバクテリアの上皮侵入を担当しているとされる繊毛とは異なる表面構造体を有している。これらは本発明により使用することができる。例えば、L.Manocytogenes の i n l A遺伝子によってコードされる表面タンパク質であるインターナリンは、腸

上皮細胞内のListeriaの内面化を担当する (Cossart, J. Cell. Biochem. Suppl. B001, pp.36 (1994); Falkow, Cell, 65, 1099-1102 (1991); Mengaudら, Cell, 84, 923-932 (1996); Lingnauら, Infect. Immun., 63, 3896-3903 (1995); Deverauxら, Infect. Immun., 63, 4268-4276 (1995))。Listeriaの内面化は上皮細胞上のE.cadherinへのインターナリンの結合に続いて誘発される (Falkow, 1991上掲; Mengaudら, 1996上掲)。インターナリンと同様の機能を有するタンパク質がYersinia pseudotuberculosisの表面に見られる。このタンパク質、インペーシンは、Y. pseudotuberculosisの外膜内に位置する986アミノ酸タンパク質である (Falkow (1991)上掲; Isberg (1985)上掲。Yersinia pseudotuberculosisによってコードされる単一遺伝子座により、Escherichia coli K-12による培養動物細胞の侵入が可能となる)。E.coli K12など他のグラム陰性バクテリアの表面上でのこのタンパク質の発現により、これらの細胞は効率的に上皮細胞に付着し上皮細胞によって内面化され得る (Falkow (1991)上掲; Isbergら (1985)上掲)。同様に、インターナリンによりコートされたラテックス粒子は、培養哺乳類細胞によって内面化される (Isberg (1991))。Y.pseudotuberculosisからの第2のタンパク質、ail 遺伝子産物が多くの真核細胞へのこれらの有機体の結合を担当するが、2~3の細胞タイプでの取り込みを促進させるだけである (上掲)。

【0055】

本発明の粒子とリンクするのに適したその他の構造体/たんぱく質には、ウィルス性赤血球凝集素として知られるウィルスの表面構造体に結合した後に、腸管または気道上皮に到達する多くのウィルスの表面たんぱく質が含まれる。このように特異的に結合するたんぱく質はロタウィル (VP7)、アデノウィルス、ノーウォークウィルスの表面に見出されていた [フクハラ (Fukuhara)ら, J.Virology, 62, 2209-2218 (1988); ヨルケン (Yolken), Lennette (編) Vol.6; 273-291 (1985)]。同じように表面赤血球凝集素もインフルエンザの取り込みと初期結合の後にウィルスの酸誘発融合を膜に誘発することが示唆されてきた [ワルトン (Wharton)ら, J. Biol. Chem., 263; 4474-4480 (1988)]。

【0056】

その他の赤血球凝集素分子はロタウイルスなどのウイルス表面に存在し、腸管上皮細胞を跨ぐこれらのウイルスの結合、インターナリゼーションおよびトランスサイトーシスを助けている[ケルヨ(Keljo)ら, J. Ped. Gastroenterol. Nutrion, 7, 249-256(1988)]。しかしながら、一部ウイルスのエンドサイトへの結合の後に表面赤血球凝縮素が分割し、結果的にエンドサイトーシスでなく細胞膜の直接的穿通でウイルスの細胞内進入を可能にする融合誘導たんぱく質の生成を示唆する証拠がある[ケルヨ(Keljo)ら, J. Virol, 62, 1136-1144 (1988) ; フクハラ (Fukuhara) ら, (1988) 同]。このような分子は腸管上皮細胞への薬剤ターゲットに幾分の用途があると思われるが、エンドサイトーシスされた物質はトランスサイトーシスされないので血液循環への薬剤送達には適当でないと思われる。

【0057】

粘膜取り込みおよび線毛、ウイルス性赤血球凝縮素などの付着因子の輸送を別にして、分子を種々の毒素や植物レクチンの結合サブユニットに共有結合的にリンクさせ、経口投与の後にリンクした分子の取り込みを誘発する可能性も見出された。本発明に拠る受容体仲介取り込みを創始する殆どの関連毒素はAB_nサブユニット構造から成るもので、サブユニットAが毒性の要因であり、Bサブユニットは毒素の特異的結合ユニットとして機能する。これらの毒素には、大腸菌易熱性毒素、コレラ毒、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)易熱性毒素、C.ボツリヌスC2毒素、破傷風毒素、ジフテリア毒素などのコレラ毒素様分子およびシュードモナス外毒素A(シアース(Sears)ら, Microbiol. Rev. 60, 167-215(1996); ワクスマン (Waksman) ら, Biochem.Biophys.Acta, 614, 249-296(1980))、ペロトキシン、シガ毒素 [オカーマン (Okerman), Veterinary Microbiol, 14, 33-46(1987)] が含まれる。これらの毒素はすべて毒性の活性を発揮するために先ず膜に結合し、次に膜を越えなければならないという共通の特性を共有する。上皮細胞に結合し、上皮細胞によってインターナライズされるのはこの毒素の能力であり、それによって分子が上皮細胞内部に輸送し、或いは上皮細胞を跨いで分子を輸送する適宜な伝達体となる。

【0058】

一般構造ABの幾つかの植物毒素は細胞に結合してインターナライズされる可

能性を持つことが特定され、本発明に拠るターゲッティングに適宜な分子である。これらの毒素はすべて経口投与で活性を示し、それゆえに腸細胞に結合し、腸細胞によってインターナライズされる能力を有する。これらの毒素にはリシン、アブリン、ビスカミン、モデシンおよびD-ガラクトースに結合するボルケンシンが含まれる[スチルペ (Stirpe) ら, FEBS, 195, 1-8(1986)]。腸管上皮細胞に結合して取り込みを起こす可能性があるその他のA-B毒素には、ボツリヌス毒素 (C.ボツリヌスからの) が含まれる[ブラウステイン(Blaustein)ら, FEBS, 225, 115-120(1987)]。

【0059】

本発明は患者体内に制御された薬剤を放出する重要な方法に関し、患者は本発明になる架橋粒子でカプセル化されたまたは内包された薬剤からなる組成物を投与される。広い意味では、この方法はどんな脊椎動物の治療、予防または診断に用いることができるが、対象とする動物は哺乳類が好適である。特に好適な動物はマウス、モルモット、ウサギなどの実験動物、猫、犬などの家庭用動物、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの飼育動物、ライオン、トラ、像などの捕獲された野生動物、人、チンパンジーおよびサルなどの霊長類である。

【0060】

本発明になる架橋粒子との複合で与えられた場合に送達される薬剤の有効量は種々のファクタに左右される。これらファクタの本質は当業者には明らかであろう。たとえば関連するファクタには、対象とする脊椎動物の種、年齢、性、動物が罹患している障害、罹患のし易さ、動物の身長および体重、送達する薬物の種類が含まれる。投与用量は架橋粒子が取り込みを助けるほかの物質とリンクしているかどうか、粒子の安定性、カプセル化されたまたは内包薬物の放出にわたって制御されるレベルにも左右され、これらは架橋の程度および架橋の種類に関連する。これらのファクタすべてが当業者によって考慮されて適切な用量が確定される。薬剤の最適または適切な用量の決定に用いられるルーチンな投与量計画は当業者に周知である。

【0061】

本発明に拠る組成物は1種類以上の薬剤に適切な担体および／または賦形剤と

共に投与することもできる。担体または賦形剤の種類は投与経路、架橋粒子の性質、対象とする薬剤の性質などのファクタに依存する。適切な薬剤の担体および賦形剤に関する完全な考察がワデ(Wade)、ウェーラー(Weller)編、「薬剤賦形剤ハンドブック (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS)」第2版(1994, The Pharmaceutical Press, London)に記載があり、その全てを参照して本明細書の一部とする。

【0062】

上述したように、本発明になる組成物は腸内または非経口投与のいずれでも投与可能である。本発明に拠る好適な実施例では経口投与であるが、投与経路はたとえば直腸投与、或いは胃または小腸への直接投与も可能である。さらに、本発明になる組成物は筋内、腹腔内、皮下、目、耳、室内、局所的、臓器内直接または他の非経口的手段で投与することもできる。これらの手段を経由する投与では、組成物が前掲「薬剤賦形剤ハンドブック」記載の適切な担体および／または賦形剤とともに適切な投与容量形態で与えられる必要があることを当業者は察知するであろう。

【0063】

本発明をこのように一般的に説明したが、本発明は以下に非限定的に例示した実施例を参照することによってより詳細に理解されるであろう。

【0064】

【実施例】

実施例1. ゼラチンおよびカルボキシメチルセルロースを用いる高分子電解質複合体生成を経由する含インスリンナノ粒子の合成

カルボキシメチルセルロース(低粘度、50~200cps)を蒸留水(DW)に5%で溶解し、1M塩酸でpHを3.9に調整した。ゼラチン(Bloom175)をDWに5%で溶解し、1M塩酸でpHを3.9に調整した。20mMのHClにインスリン20mg/mlを溶解し、400 μ lを60℃に加熱したゼラチン4.0mlに加えた。インスリン／ゼラチン混合物を激しく攪拌しながらカルボキシメチルセルロース(5%)2.0mlに加えた。攪拌を15分継続し、この間に12mlのDWを加えた。アジピルヒドラジド(100mg/ml DW, 48mg)を溶液に加え、次にEDTA(100mg/ml)48mgを加えた。溶液を4時間以上攪拌した後にDWに

対向させて完全透析した。

【0065】

実施例2. 高分子電解質複合体生成を経由する含インスリンゼラチン／ポリグルタメートナノ粒子の合成

ポリグルタメート(17,500MW)を蒸留水(DW)に0.25%で溶解し、1M塩酸でpHを3.9に調整した。ゼラチン(Bloom175)をDWに5%で溶解し1M塩酸でpHを3.9に調整した。20mMのHClにインスリン20mg/mlを溶解し、350 μ lを60℃に加熱したゼラチン4.0mlに加えた。激しく攪拌しながらインスリン／ゼラチン混合物をゆっくり0.25%のポリグルタメート4.0mlに加えた。攪拌を15分継続し、この間に8mlのDWを加えた。アジピルヒドラジド(100mg/ml DW, 5mg)を溶液に加え、次にEDTA(100mg/ml)5mgを加えた。溶液を4時間以上攪拌した後にDWに対向させて完全透析した。

【0066】

実施例3. 高分子電解質複合体生成を経由する含インスリンゼラチン／アルギネートナノ粒子の合成

ナトリウムアルギネート(低粘度、250cps)を蒸留水(DW)に1.25%で溶解し、1M塩酸でpHを3.9に調整した。ゼラチン(Bloom175)をDWに1.25%で溶解し、1M塩酸でpHを3.9に調整した。120mMのHClにインスリン20mg/mlを溶解し、1.0mlを60℃に加熱したゼラチン5.0mlに加えた。激しく攪拌しながらインスリン／ゼラチン混合物をゆっくりアルギネート(1.25%)10.0mlに加えた。攪拌を15分継続し、この間に15mlのDWを加えた。アジピルヒドラジド(60mg@, 100mg/ml DW)を溶液に加え、次にEDTA(100mg/ml)60mgを加えた。溶液を4時間以上攪拌した後にDWに対向させて完全透析した。

【0067】

実施例4. ラット腹腔内注入後のゼラチン／CMC高分子電解質複合体ナノ粒子からのインスリンのインビボ放出

雄性ウィスターラットを抑制装置に入れ、意識のあるラットの尾静脈から血液試料を採取した。次にインスリン100 μ g用量または100 μ gのインスリンを含むゼラチン／CMCナノ粒子のプレパラートのいずれかをラット腹腔内に注入した。注

入後60,120,180,240および300分にラット尾静脈から血液を採取した。収集した血液を4℃で凝固させ、その後で血清を遠心分離した。血液のグルコースレベルを市販のSigma(#GAGO-20)などの標準グルコースアッセイを用いて測定した。結果を図1に示す。

【0068】

実施例5. EDTAおよびアジピルヒドラジッド濃度を変動させることによる高分子電解質複合体(PEC)ナノ粒子からのインスリン放出の修飾

PECナノ粒子からのインスリン放出速度を上記手順の任意の方法で生成したPECナノ粒子の架橋に使用したEDTAおよびアジピルヒドラジッド濃度を変動させることで修飾した。放出速度は架橋リンカーの濃度を減少させることで増加した。逆に、架橋リンカー濃度の増加で放出速度は減少した(図2参照)。

【0069】

実施例6. ヒドラジディル-ポリグルタミン酸の調製

ポリグルタミンをDWに25.8mg/mlでDWに溶解した。アジピルヒドラジド(87mg/ml DW)をポリグルタメートに2:5の容積割合で加えた。固形EDTA(4mg/mlポリグルタメート)を溶液に加え、2時間反応させた。得られた溶液をDWに対向させて完全透析し、凍結乾燥した。

【0070】

実施例7. ヒドラジディル-カルボキシメチルセルロースの調製

カルボキシメチルセルロースをDWに25mg/mlでDWに溶解した。アジピルヒドラジド(87mg/ml DW)をポリグルタメートに2:5の容積割合で加えた。固形EDTA(4mg/mlカルボキシメチルセルロース)を溶液に加え、2時間反応させた。得られた溶液をDWに対向させて完全透析して凍結乾燥した。

【0071】

実施例8. インスリンを含有しアジピルヒドラジディル-ポリグルタミン酸とゼラチンから生成させたPECナノ粒子の調製

アジピルヒドラジディル-ポリグルタメートをDWに2.5mg/mlでDWに溶解し、1.0M塩酸でpHを3.9に調整した。インスリンを20mMのHClに20mg/mlで溶解し、60℃に加熱したゼラチン溶液(Bloom175, 10mg/ml DW, pH3.9)に加えてゼラチン中0.8m

g/mlのインスリン溶液とした。溶液を等容積の温(60℃)アジピル-ヒドラジディール-ポリグルタメートに激しく攪拌しながら加えた。攪拌を15分継続した後に溶液を1:3 DWで希釈した。クエン酸(100mg/ml)を等容積のNHS(100mg/mlアセトン)に混合し、重量で2倍過剰のEDACと反応させてNHS-エステルを調製した。10分間活性化した後、NHS₂-クエン酸塩をマイクロ粒子にアジピル-ヒドラジディール-ポリグルタメートと等重量で加えた。一晩かけて反応を進行させた後に反応物をDWに対向させて完全透析した。

【0072】

実施例9. インスリンを含有しヒドラジディール-カルボキシメチルセルロースとゼラチンから生成させたPECナノ粒子の調製

アジピル-ヒドラジディール-カルボキシメチルセルロースをDWに25mg/mlでDWに溶解し、1.0M塩酸でpHを3.9に調整した。インスリンを20mMのHClに20mg/mlで溶解し、60℃に加熱したゼラチン溶液(Bloom175, 8mg/ml DW, pH3.9)に加えてゼラチン中0.8mg/mlインスリン溶液とした。溶液を1/2容積の温(60℃)アジピル-ヒドラジディール-カルボキシメチルセルロースに激しく攪拌しながら加えた。攪拌を15分継続した後に溶液を1:3DWで希釈した。クエン酸(100mg/ml)を等容積のNHS(100mg/mlアセトン)に混合し、重量で2倍過剰のEDACと反応させてNHS-エステルを生成させた。10分間活性化した後、NHS₂-クエン酸塩をマイクロ粒子にアジピル-ヒドラジディール-カルボキシメチルセルロースと等重量で加えた。一晩かけて反応を進行させた後に反応物をDWに対向させて完全透析した。

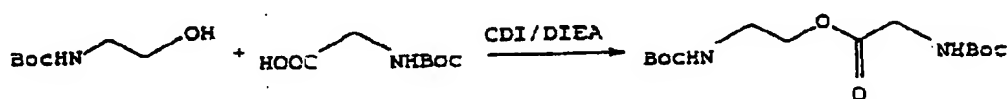
【0073】

実施例10. 2-アミノエチル-2-アミノエタノエート(AEAE)の調製

(a) Boc-グリシンと Boc-エタノールアミンとのカップリング

【0074】

【化4】



【0075】

Boc-グリシン (12.0g, 0.068mol) とカルボニルジイミダゾール (12.1g, 0.074mol) とをDMF (50mL) に溶解した。激しくCO₂を発生する溶液を室温で1時間攪拌した。Boc-エタノールアミン (10.0g, 0.062mol) のDMF (10mL) 溶液を活性エステル溶液に滴下させて加え、次にDIEA (11.9mL, 8.80g, 0.068mol) を加えて常温で一晩攪拌を継続した。溶液を水 (200mL) に注入しエーテル (3x75mL) で抽出し、炭酸水素ナトリウム飽和液で洗浄した (1x100mL)。MgSO₄ で乾燥して溶媒を除去し無色油状生成物 (18.1g, 92%) を得た。生成物はさらに純化しないで使用した。

【0076】

(b) Boc-保護基の除去およびスクシニル化

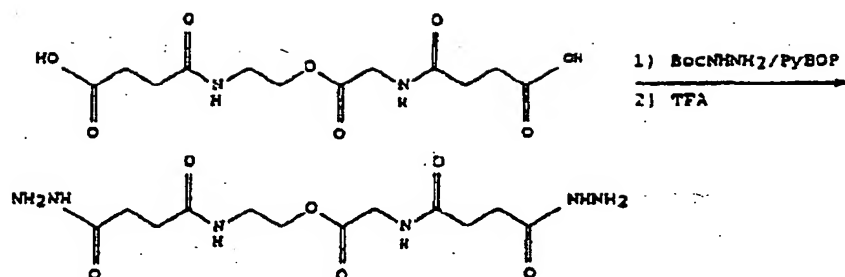
粗ジ-Bocエステル (22.9g, 0.072mol) を0℃でトリフルオロ酢酸 (20mL) に溶解した。激しくCO₂を発生する溶液を0℃で1時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を減圧下で除去し、残渣をアセトニトリル (30mL) に溶解してから溶媒を除去した。粗ビス-TFA塩をTHF (20mL) に溶解し、固形無水炭酸カリ (20g) を加えて混合物を室温で1時間攪拌した。溶液を乾燥し (Na₂SO₄)、溶液を無水コハク酸 (22.7g, 0.23mol) のTHF (120mL) 溶液に濾過注入した。DIEA (30mL, 22.3g, 0.17mol) を加えてアルカリ性溶液とし室温で攪拌を続けた。1時間間隔でDIEAのアリコート (5mL, 3.7g, 0.029mol) を2回加えて24時間攪拌を継続した。減圧下で大部分のTHFを除去し懸濁物を炭酸水素ナトリウム飽和溶液 (200mL) と酢酸エチル (100mL) との2相溶液に注入した。有機層を除去し水溶液層を酢酸エチル (100mL) で抽出した。水溶液層を塩酸 (10M) でpH1の酸性にして酢酸エチル (3x150mL) で抽出し、乾燥 (Na₂SO₄) して溶媒を除去した。残渣をエーテル (50mL) に懸濁させ0℃に冷却してから濾過して微細な針状生成物 (6.01g, 25%) を得た。

【0077】

(c) ジヒドラジディルエステル架橋リンカーの調製

【0078】

【化5】



【0079】

前述の二酸 (987mg, 3.10mmol) のDMF (20mL) 溶液に PyBOP (3.72g, 7.15mmol) と *t*-ブチルカルバゼート (950mg, 7.19mmol) を加え、次に DIEA (2.20mL, 1.65g, 0.013mol) を加えて室温で一晩撹拌を続けた。溶液を炭酸水素ナトリウム飽和溶液 (100mL) に注入し、酢酸エチルで抽出 (3x50mL)、乾燥 (MgSO₄) して溶媒を除去し、残った油状生成物を TFA (10mL) に溶解して室温で1時間撹拌した。エタノールを加え (20mL) 減圧下で溶媒を除去してジヒドラジドが黄色油状生成物として得られた (506mg, 47%)。

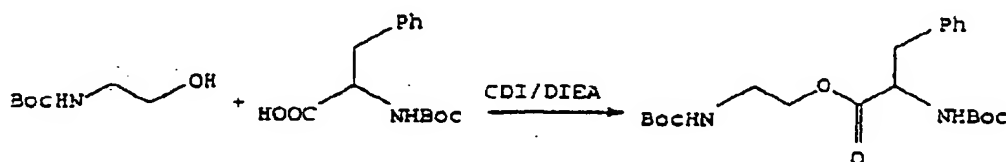
【0080】

実施例11. 2-アミノエチル-2-アミノ-ベンジルエタノエート (AEABE) の調製

(a) Boc-フェニルアラニンと Boc-エタノールアミンとのカップリング

【0081】

【化6】



【0082】

Boc-フェニルアラニン (15.7g, 0.059mol) とカルボニルジイミダゾール (10.1g, 0.062mol) とを DMF (60mL) に溶解した。激しく CO₂ を発生する溶液を室温で1時間撹拌した。Boc-エタノールアミン (9.35g, 0.058mol) の DMF (10mL) 溶液を活性エステル溶液に滴下させて加え、次に DIEA (12.0mL, 8.9g, 0.069mol) を加えて常温で一晩撹拌を継続した。溶液を水 (200mL) に注入しエーテルで抽出 (3x75mL) し、炭酸水素ナトリウム飽和液で洗浄した (1x100mL)。MgSO₄ で乾燥して溶媒を除去し無

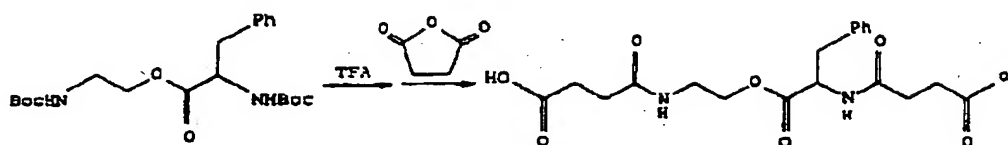
色油状生成物(18.15g, 92%)を得た。生成物を最後に固形化させ、さらに純化しないで使用した。

【0083】

(b) Boc-保護基の除去およびスクシニル化

【0084】

【化7】



【0085】

粗ジ-Bocエステル(9.83g, 0.024mol)を0℃でトリフルオロ酢酸(20mL)に溶解した。激しくCO₂を発生する溶液を0℃で1時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を減圧下で除去し、残渣をアセトニトリル(30mL)に溶解してから溶媒を除去した。粗ビス-TFA塩をTHF(20mL)に溶解し、固形無水炭酸カリ(20g)を加えて混合物を室温で1時間攪拌した。溶液を乾燥し(Na₂SO₄)、溶液を無水コハク酸(4.98g, 0.050mol)のTHF(30mL)溶液に濾過注入した。DIEA(20mL, 14.8g, 0.11mol)を加えてアルカリ性溶液として室温で24時間攪拌を続けた。減圧下で大部分のTHFを除去し懸濁物を炭酸水素ナトリウム飽和溶液(200mL)と酢酸エチル(100mL)との2相溶液に注入した。有機層を除去し水溶液層を酢酸エチル(100mL)で抽出した。水溶液層を塩酸(10mL)でpH1の酸性にして酢酸エチルで抽出(3x150mL)し、乾燥(Na₂SO₄)して溶媒を除去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサンから再結晶し、無色粉末生成物(2.04g, 22%)を得た。

【0086】

実施例12. イソブチルシアノアクリレート(IBC)とカルボキシメチルセルロースを用いる含インスリンナノ粒子の調製

インスリンを0.1Mの塩酸に100mg/mLで溶解した。インスリンのアリコート(120μL)を等量のミグリオル(miglyol)と混ぜ合わせた。溶液を急速渦動化し、エタノール12mLを加えて溶液を再度渦動化した。最後に120μLのIBCを加え、溶液をゆっくり24mLの0.25%PE6800中に滴下した。15分後に6mLの0.25%CMCを溶液に加え、

90分さらに攪拌を続けた。次に溶液を等容積に二分し、一方の溶液にアジピルジヒドラジド(AH)24mgと48mgのEDACを加えた。ラットで試験する前に、粒子を一晩架橋させた。図3にみられるように、EDACとAHをナノ粒子に添加すると、血清グルコースの修飾で判断されるように、インスリン放出速度が著しく増加する。

【0087】

実施例13. エステラーゼで切断可能なAEABEで架橋したインスリン含有高分子電解質ナノ粒子の調製

アジピル-ヒドラジデイル-カルボキシメチルセルロースをDWに2.5mg/mlで溶解し、1.0Mの塩酸でpHを3.9に調整した。インスリンを20mMのHClに20mg/mlで溶解し、8mgをゼラチンの2.5mg/ml溶液(pH3.9)2mlに加えた。溶液を16mlの温(60℃)アジピル-ヒドラジデイル-カルボキシメチルセルロースに激しく攪拌しながら加えた。攪拌を15分継続した後に、溶液を4個の等容量試料に分割した。AEABE(40mg@100mg/ml)を30mgのNHS(100mg/ml DMF)に混合し、60mgのEDACと反応させてNHS-エステルを生成させた。10分間活性化した後に、 NHS_2 -AEABEのアリコート20,10および5mgをナノ粒子に加えた。一晩かけて反応を進行させ、次にラットの腹腔内に投与して試験した。図4に示すように、エステラーゼ切断可能架橋リンカーの量を増加するとインビボでのインスリン放出が減少した。

【0088】

実施例14. エステラーゼで切断可能なAEABEで架橋したインスリン含有IBCAナノ粒子の経口投与

インスリンを0.1Mの塩酸に100mg/mlで溶解した。インスリンのアリコート(120 μ l)を等量のミグリオル(miglyol)と混ぜ合わせた。溶液を急速渦動化し、エタノール12mlを加えて溶液を再度渦動化した。最後にIBCAの120 μ lを加え、溶液をゆっくり24mlの0.25%PE6800に滴下した。15分後に6mlの0.25%アジピル-ヒドラジデイル-DMCを溶液に加え、一晩攪拌を続けた。次に粒子を22mlまでに濃縮した。AEABE(60mg@100mg/ml)を60mgのNHS(100mg/ml DMF)と混合し、60mgのDCC[ジシクロヘキシルカルボジイミド(Dicyclohexylcarbodiimide), 103mg/ml DMF]との反応によってNHS-エステルを生成させた。10分活性化の後、 $(\text{NHS})_2$ -AEABEの5および40mgアリコートをナノ粒子のアリコート11mlに加えた。一晩かけて反応を進

行させた。次に粒子をDWに対向させて完全に透析し、遊離のAEABEを除去した。それぞれの試料をさらに二分した。一方の溶液にアジピルジヒドラジド-eVB12 (20mg) と20mgのEDACを加え、他の試料にはTSTU-活性化eVB12(20mg)24gを加え、2時間反応させた。次に試料を蒸留水に対向させて透析し、ラットに経口投与して試験した。図5に示すように、調製した全ての粒子が経口投与後、5時間に渡って血清グルコースの減少を示した。

【0089】

本明細書に用いた用語「を含む」、或いはその類義語「から成る」の含意は文脈上の必需がない限り言及された要素または完全体、或いは要素または完全体の群を包含し、他のいかなる要素または完全体、或いは要素または完全体の群を排除するものでない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、オスのウィスターラットに、インシュリン、ならびにゼラチンおよびカルボキシメチルセルロース(CMC)から形成された架橋結合粒子内に捕捉されたインシュリンを静脈内投与した後の血清グルコースレベルの変化のプロットを示す。このプロットは、(時間0での血清グルコース濃度に対する)血清グルコース濃度のパーセンテージを時間に対して示す。投与後0、1、2、3、4、5および6時間経過した時点で血液分析を行った。ラットには、架橋結合度の高い粒子、中程度の架橋結合粒子、架橋結合度の低い粒子、またはインシュリンコントロールのいずれかが投与される。各ラットには、100 μ gのインシュリンか、または100 μ gのインシュリンを含有する粒子製剤のいずれかを投与した。

【図2】

図2は、オスのウィスターラットに、インシュリン、ならびにゼラチンおよびポリグルタミン酸[Gel/P-Glu]またはゼラチンおよびアジピルヒドラジド[Gel/AH-P-Glu]から形成された架橋結合粒子内に捕捉されたインシュリンを静脈内投与した後の血清グルコースレベルの変化のプロットを示す。このプロットは、(時間0での血清グルコース濃度に対する)血清グルコ

ース濃度のパーセンテージを時間に対して示す。投与後0、1、2、3、4、5および6時間経過した時点で血液分析を行った。各ラットには、 $100\mu\text{g}$ のインシュリンか、または $100\mu\text{g}$ のインシュリンを含有する粒子製剤のいずれかを投与した。

【図3】

図3は、インシュリン含有粒子の投与によるラットのグルコースレベルへの効果を示す。EDACおよびAHを含む架橋結合の場合に、粒子からのインシュリン放出速度が大きく低下した。

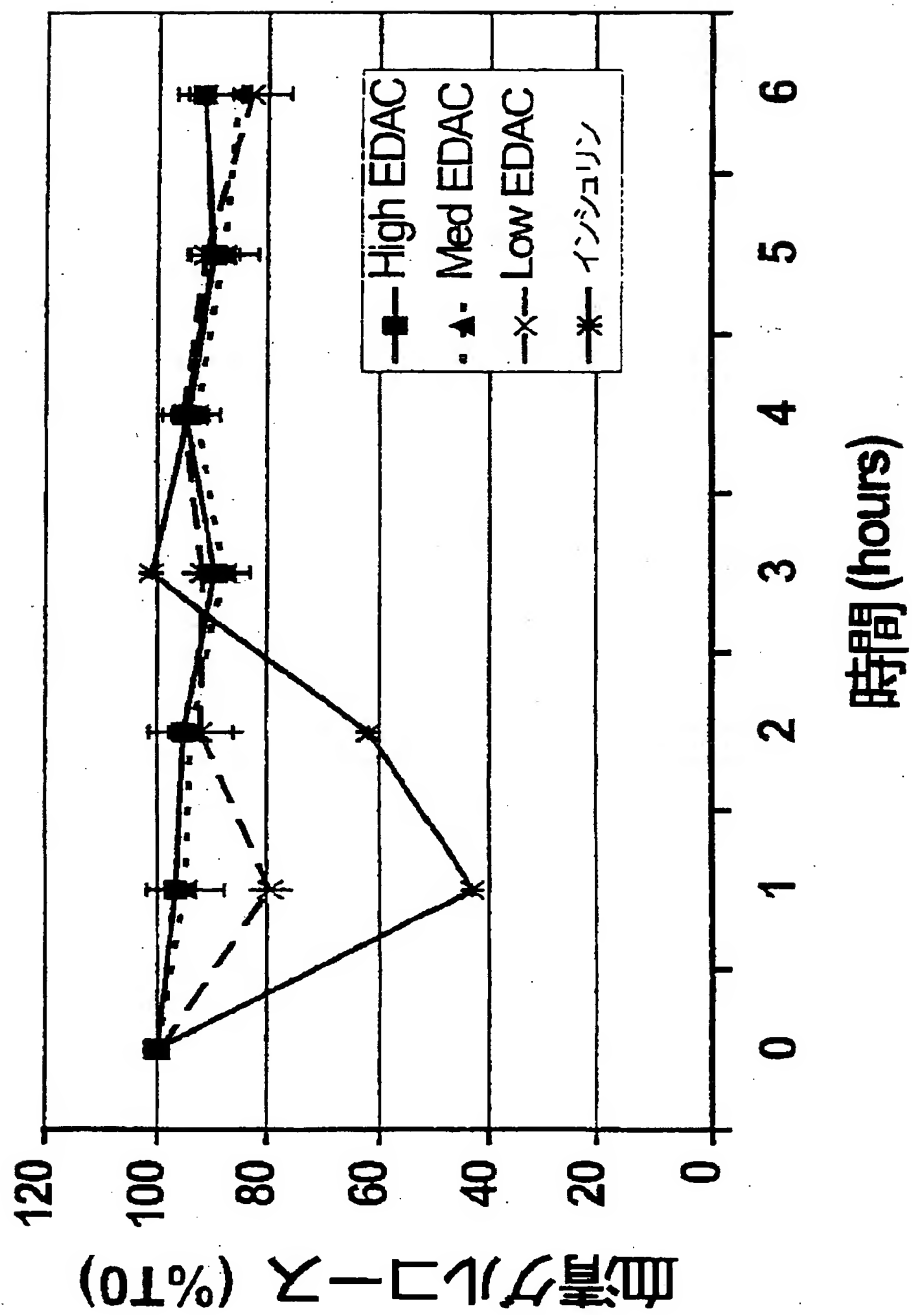
【図4】

図4は、エステラーゼ切断可能架橋結合剤の増量が、AH-CMCナノ粒子からのインシュリンのインビボでの放出速度に与える効果を示す。

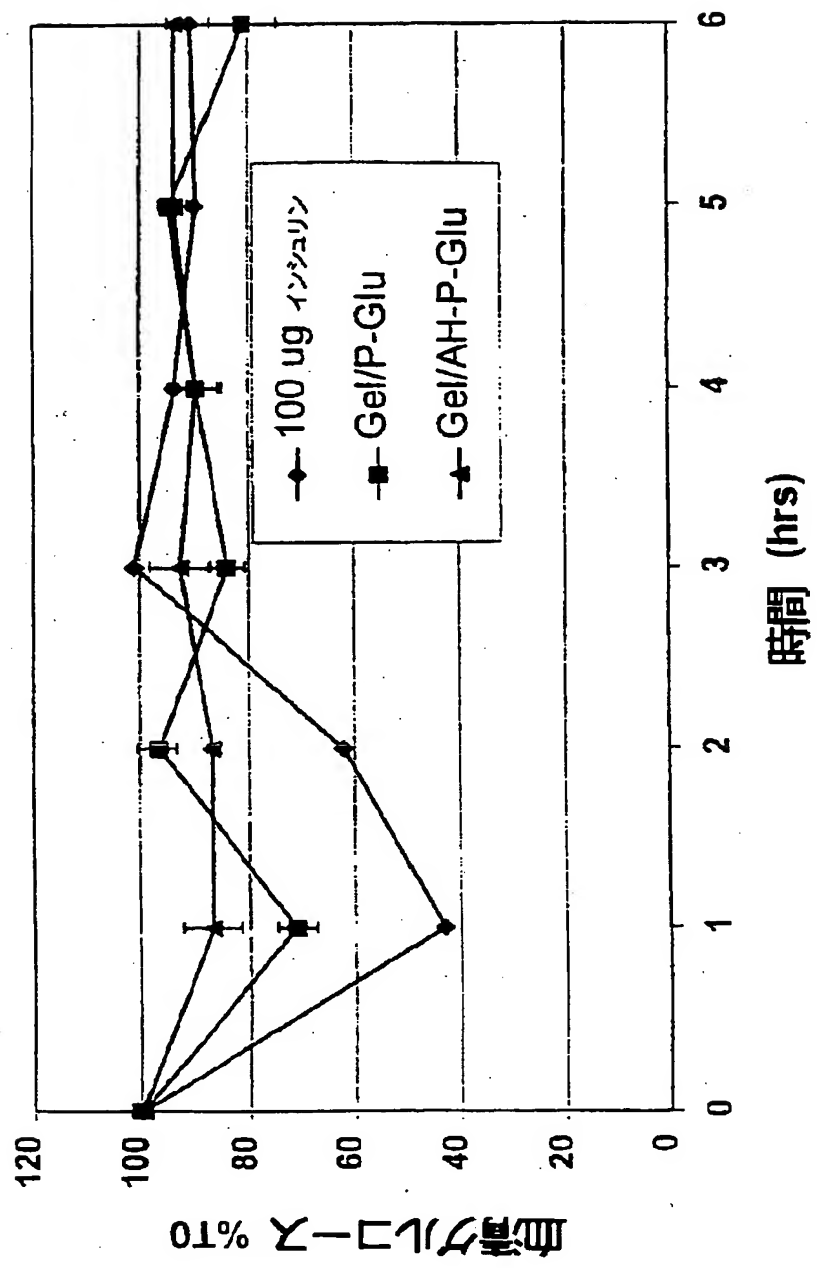
【図5】

図5は、ビタミンB12共役インシュリン含有IBCAナノ粒子の経口投与後、ラットの血清グルコースレベルが低下することを示す。

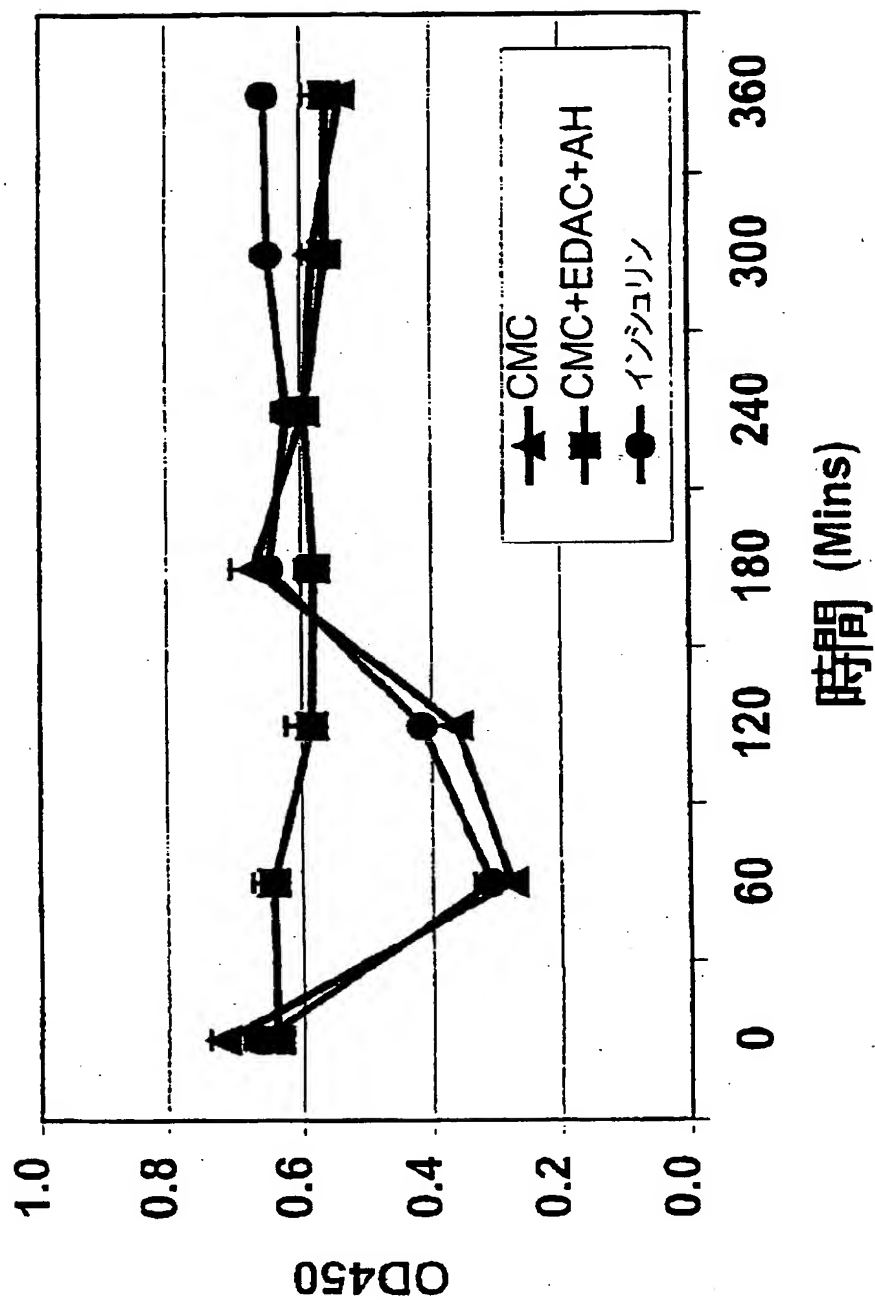
【図1】



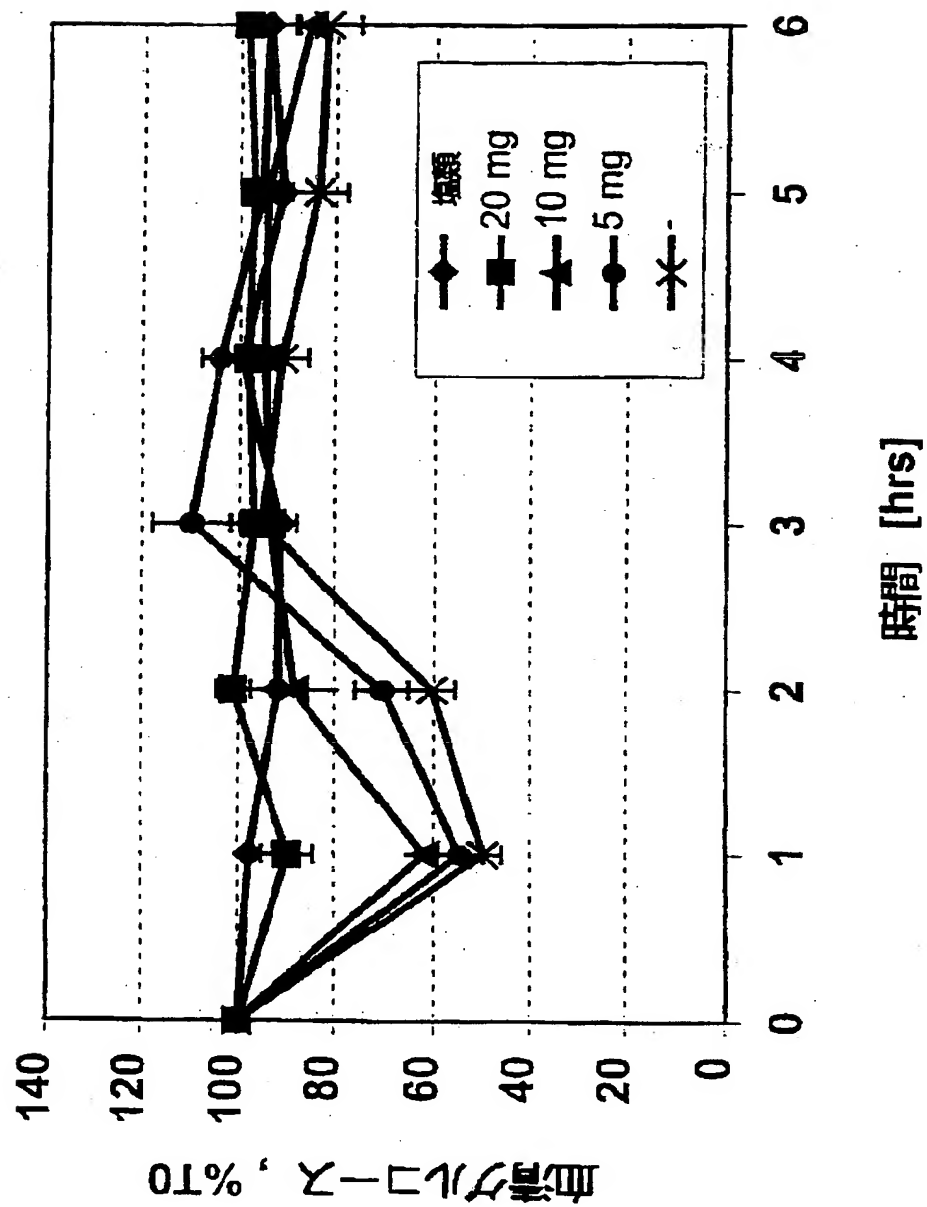
【図2】



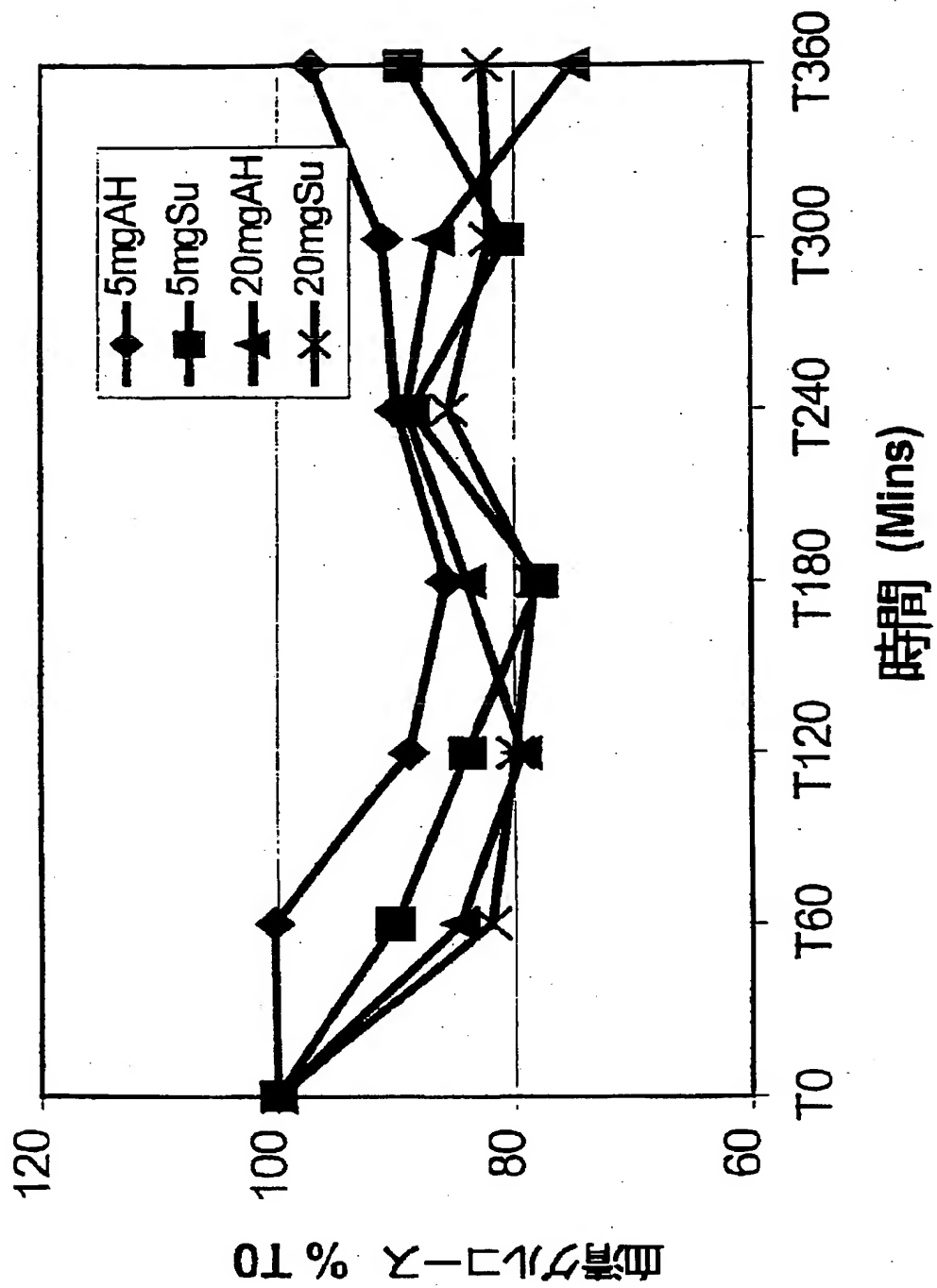
【図3】



【図4】



【図5】



【手続補正書】 特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】 平成12年2月29日 (2000. 2. 29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含み、医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子であって、ここで該ポリマーがヒドラジンおよび $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CONHNH}_2$ の化学式からなる群から選ばれたスペーサーを介して共有結合的に架橋される反応性カルボキシル基を含有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、架橋粒子。

【請求項2】 該スペーサーが、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項1の架橋粒子。

【請求項3】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含み医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子であって、ここで、該ポリマーが、マロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘

導体で、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれたスペーサーと共有結合で結合される、反応性のアミノ、ヒドラジジル、またはチオール基を含有しているポリマーである、架橋粒子。

【請求項4】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含み、医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子であって、ここで該ポリマーが

(i) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基と、

(ii) 少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つのヒドラジジル基を含有するスペーサーとが、共有結合されている、架橋粒子。

【請求項5】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項1～4のいずれかの架橋粒子。

【請求項6】 該生分解性の結合がエステル結合である、請求項5の架橋粒子。

【請求項7】 該スペーサーがアミノ酸の2アミノエチルエステルである請求項6の架橋粒子。

【請求項8】 該スペーサーが、グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステル、およびグリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのジスクシンイミジル誘導体からなる群より選ばれたものである、請求項7の架橋粒子。

【請求項9】 グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのスクシンイミジル誘導体が、N, N'-ジスクシンイミジル- (2-アミノ-2-ベンジルエタン酸)、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-エチル-エタン酸、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)からなる群より選ばれる、請求項8の架橋粒子。

【請求項10】 該粒子が目標の化合物と共有結合されている、請求項1～9のいずれかの架橋粒子。

【請求項11】 請求項1～10のいずれかの架橋粒子の内部に医薬用薬剤

が内包されることを含む組成物。

【請求項12】 該医薬用薬剤が、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、）、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群より選ばれる、請求項11の組成物。

【請求項13】 該医薬用薬剤が、カルシトニン、エリトロポイエチン、トロンプオイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）類似体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群より選ばれる、請求項12の組成物。

【請求項14】 医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子を製造する方法であって、粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを架橋することを含み、

ここで、該ポリマーは反応性のカルボキシル基を含有しており、

ここで、該スペーサーはヒドラジンおよび $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CONHNH}_2$ の化学式からなる群から選ばれ、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものであり、

ここで、該架橋反応はカルボジイミドを架橋剤に使用することにより達成される、

方法。

【請求項15】 該スペーサーが、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項14の方法。

【請求項16】 医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子を製造する方法であって、粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを架橋することを含み、

ここで、該ポリマーは反応性のアミノ、ヒドラジジル、またはチオール基を含有しており、

ここで、該スペーサーはマロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体で、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれ、

ここで、該架橋反応はカルボジイミドを架橋剤に使用することにより達成される方法。

【請求項17】 医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子を製造する方法であって、粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを架橋することを含み、

ここで、該ポリマーはカルボキシル、ヒドラジジル、アミノまたはチオール基から選ばれた反応性基を含有しており、

ここで、該スペーサーは少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つのヒドラジジル基を含有しており、

ここで、該架橋反応はカルボジイミドを架橋剤に使用することにより達成される方法。

【請求項18】 該カルボジイミドが、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N' N'-ジ-t-ブチルカルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノ-シクロヘキシル)カルボジイミド、1, 3-ジ-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(1-ジエチルアミノエチル)カル

ボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4)-エチル)カルボジイミド、および1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチル-アミノシクロヘキシル)カルボジイミドからなる群より選ばれたものである、請求項14～17のいずれかの方法。

【請求項19】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項14～18のいずれかの方法。

【請求項20】 架橋粒子の内部に医薬用薬剤を含有する組成物を製造する方法であって、該医薬用薬剤の存在下に、粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーと架橋反応させることを含み、
ここで、該ポリマーは反応性のカルボキシル基を含有しており、
ここで、該スペーサーはヒドラジンおよび $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CONHNH}_2$ の化学式からなる群から選ばれ、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものであり、
ここで、該架橋反応はカルボジイミドを架橋剤に使用することにより達成される、
方法。

【請求項21】 該スペーサーが、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項20の方法。

【請求項22】 架橋粒子の内部に医薬用薬剤を含有する組成物を製造する方法であって、該医薬用薬剤の存在下に、粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを架橋反応させることを含み、
ここで、該ポリマーは反応性のアミノ、ヒドラジジル、またはチオール基を含有

しており、

ここで、該スペーサーはマロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体で、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれ、

ここで、該架橋反応はカルボジイミドを架橋剤に使用することにより達成される

方法

【請求項23】 架橋粒子の内部に医薬用薬剤を含有する組成物を製造する方法であって、該医薬用薬剤の存在下に、粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーとスペーサーとを架橋反応させることを含み、

ここで、該ポリマーはカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよびチオール基から選ばれた反応性基を含有しており、

ここで、該スペーサーは少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つのヒドラジジル基を含有しており、

ここで、該架橋反応はカルボジイミドを架橋剤に使用することにより達成される

方法。

【請求項24】 該カルボジイミドが、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N,N'-ジ-*t*-ブチルカルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノ-シクロヘキシル)カルボジイミド、1,3-ジ-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(β -ジエチルアミノエチル)カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4)-エチル)カルボジイミド、および1-シクロヘキシル-3-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミドからなる群より選ばれたものである、請求項20~23のいずれかの方法。

【請求項25】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項20～24のいずれかの方法。

【請求項26】 該医薬用薬剤が、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群より選ばれる、請求項20～25のいずれかの方法。

【請求項27】 該医薬用薬剤が、カルシトニン、エリトロポイエチン、トロポポイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)類縁体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群より選ばれる、請求項26の方法。

【請求項28】 患者の体内に医薬用薬剤を調節しながら放出することを目指す方法であって、該患者に架橋粒子の内部の医薬用薬剤を含有する組成物の有効量を投与することからなり、ここで、該架橋粒子は粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含有し、
ここで、該ポリマーがヒドラジンおよび $\text{NH}_2\text{NHCO}-\text{R}-\text{CONHNH}_2$ の化学式からなる群から選ばれたスペーサーを介して共有結合的に架橋される反応性カルボキシル基を含有しており、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基またはアリアル基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、
方法。

【請求項29】 該スペーサーが、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項28の方法。

【請求項30】 患者の体内に医薬用薬剤を調節しながら放出することを目的とする方法であって、該患者に架橋粒子の内部の医薬用薬剤を含有する組成物の有効量を投与することからなり、ここで、該架橋粒子は粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含有し、

ここで、該ポリマーが、マロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体で、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれたスペーサーと共有結合で結合される、反応性のアミノ、ヒドラジジル、またはチオール基を含有しているポリマーである、

方法。

【請求項31】 患者の体内に医薬用薬剤を調節しながら放出することを目的とする方法であって、該患者に架橋粒子の内部の医薬用薬剤を含有する組成物の有効量を投与することからなり、ここで、該架橋粒子は粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含有し、

ここで、該ポリマーが、

(i) カルボキシル、ヒドラジジル、アミノ、およびチオール基からなる群より選ばれた反応性基と、

(ii) 少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つのヒドラジジル基を含有するスペーサーとが、共有結合されている、

方法。

【請求項32】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項28～31のいずれかの方法。

【請求項33】 該生分解性の結合がエステル結合である、請求項32による架橋粒子。

【請求項34】 該スペーサーがアミノ酸の2アミノエチルエステルである請求項33の架橋粒子。

【請求項35】 該スペーサーが、グリシンおよびフェニルアラニンの2-

アミノエチルエステル、およびグリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのジスクシンイミジル誘導体からなる群より選ばれたものである、請求項34の架橋粒子。

【請求項36】 グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのスクシンイミジル誘導体が、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-2-ベンジルエタン酸)、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-エチル-エタン酸、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)からなる群より選ばれる、請求項35の架橋粒子。

【請求項37】 該粒子が目標の化合物と共有結合されている、請求項28~36のいずれかの方法。

【請求項38】 該医薬用薬剤が、ペプチドおよびタンパク質医薬品、DNA、RNA、抗体、ワクチン、造影剤、ホルモン、多糖、抗生物質、抗凝血剤、免疫調節剤、細胞障害性薬剤、ステロイド、うっ血除去剤、麻酔剤、鎮静剤からなる群より選ばれる、請求項28~37のいずれかの方法。

【請求項39】 該医薬用薬剤が、カルシトニン、エリトロポイエチン、トロポポイエチン、顆粒状コロニー刺激因子、幹細胞因子、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)類縁体、ソマトスタチン、インスリン、インターフェロンおよびプラスミノゲン活性化阻害剤からなる群より選ばれる、請求項38の方法。

【請求項40】 医薬用薬剤を送達するための組成物であって、架橋粒子と該架橋粒子に内包される医薬用薬剤とからなり、
ここで、該粒子はスペーサー成分を介してポリアニオンポリマーにポリカチオンポリマーが架橋したものを含み、
ここで、該スペーサー成分はカルボキシル、ヒドラジジル、アミノおよびチオール基からなる群から選ばれた少なくとも二つの反応性基を含有している、
組成物。

【請求項41】 該スペーサーはヒドラジンおよび $\text{NH}_2\text{NHCO-R-CO}\text{NHNH}_2$ の化学式からなる群より選ばれ、ここでRは、直接つないでいる結合であるか、直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル

基またはアリール基であり、これらのアルキル基、アルケニル基、アルキニル基においては、その炭素原子数が10までのものである、請求項40の組成物。

【請求項42】 該スペーサーが、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、マレイン酸ジヒドラジド、フマル酸ジヒドラジドまたはブタジエン酸ジヒドラジド、グルタミン酸ジヒドラジド、アスパラギン酸ジヒドラジド、リンゴ酸ジヒドラジド、酒石酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、およびフタル酸ジヒドラジドからなる群より選ばれたものである、請求項40の組成物。

【請求項43】 該スペーサーが、マロン酸、マレイン酸、リンゴ酸、クエン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸、アジピン酸、グルタル酸、ジメチルグルタル酸、シュウ酸、フマル酸、フタル酸、酒石酸、イソフタル酸、およびテレフタル酸およびそれらの分岐アルキル誘導体で、ここで該アルキル誘導体のアルキル基は炭素原子数が10までであるようなものからなる群より選ばれる、請求項40の組成物。

【請求項44】 該スペーサーが、少なくとも一つの反応性カルボキシル基と少なくとも一つのヒドラジジル基を含有する、請求項40の組成物。

【請求項45】 該スペーサーが少なくとも一つの生分解性の結合を含有する、請求項40～44のいずれかの組成物。

【請求項46】 該生分解性の結合がエステル結合である、請求項45の組成物。

【請求項47】 該スペーサーがアミノ酸の2アミノエチルエステルである請求項46の組成物。

【請求項48】 該スペーサーが、グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステル、およびグリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのジスクシンイミジル誘導体からなる群より選ばれたものである、請求項47の組成物。

【請求項49】 グリシンおよびフェニルアラニンの2-アミノエチルエステルのスクシンイミジル誘導体が、N, N'-ジスクシンイミジルー（2-アミ

ノ-2-ベンジルエタン酸)、N, N'-ジスクシンイミジル-2-アミノ-エチル-エタン酸、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)からなる群より選ばれる、請求項48の組成物。

【請求項50】 該粒子が目標の化合物と共有結合されている、請求項40～49のいずれかの組成物。

【請求項51】 粒子を形成しうる少なくとも一つのポリマーを含み、医薬用組成物を送達するのに適した架橋粒子であって、ここで該ポリマーが反応性のシアノアクリレートを紹介してスペーサーに架橋されている、架橋粒子。

【請求項52】 該スペーサーが、2-アミノエチル-2-アミノ-2-ベンジル-エタン酸である、請求項51の粒子。

【請求項53】 該シアノアクリレートがイソブチルシアノアクリレートである請求項51または52の粒子。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB 98/01464
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁶ : C08L 1/28, 5/04, 77/04, 89/06 C08G 69/10 C08B 15/10 C08J 3/24 A61K 9/52		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC C08L 1/28, 5/04, 77/04, 89/06 C08G 69/10 C08B 15/10 A61K 9/52		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPAT: [IPC as above] and CROSS: JAPIO: as above in WPAT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	AU 35853/97 A (G.D. SEARLE AND CO) 31 December 1997 Page 74, Example 2, pages 85-95	1, 8, 18, 19, 29, 39
X	AU 54638/96 A (KIMBERLY-CLARK CORPORATION) 1 August 1996 Examples 1 and 2	1
X	US 5284936 A (DONACHY et al) 8 February 1994 Example 1	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 November 1998		Date of mailing of the international search report 27 NOVEMBER 1998
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No.: (02) 6285 3929		Authorized officer N. L. KING Telephone No.: (02) 6283 2150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. --
PCT/IB 98/01464

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
AU	35853/97	WO	9749387	AU	36496/97		
AU	54638/96	AU	36949/93	CA	2076732	EP	566118
		JP	6025303	MX	9301563	US	5550189
		AU	10845/95	BR	9407917	CA	2130427
		CN	1139437	CZ	9601223	EP	739357
		HU	75504	PL	317098	SK	499/96
		WO	9511925				
US	5284936	CA	2107216	EP	580702	US	5247068
		WO	9217525	US	5284936		
AU	75565/94	WO	9505162	EP	664698	US	5487895
END OF ANNEX							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 98/01464

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AU 75565/94 A (VITAPHORE CORPORATION) 23 February 1995 Examples 4 and 5	1, 8, 21, 29, 39
X	JP 2235902 A (NISSHIN SPINNING KK) 18 September 1990 Derwent Abstract Accession No. 90-326123 Abstract	1

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
C 0 8 L	1/28	C 0 8 L	1/28
	5/04		5/04
	77/04		77/04
	89/06		89/06
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, D K, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, L V, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U S, UZ, VN, YU, ZW		
(72)発明者	スターリング, スコット マシュー オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェ ールズ 2207, ベックスレー、キングスラ ンド・ロード 11		
(72)発明者	マッケヴァン, ジョン ファーガス オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェ ールズ 2223, オートレー、レッティア・ ストリート 3/3		

F ターム(参考) 4C076 AA64 AA65 AA67 AA95 CC01
CC04 CC06 CC07 CC11 CC21
CC30 CC32 CC41 CC50 DD49
DD52 EE24 EE26 EE32 EE41
EE42 EE58 FF31 FF36 FF63
GG22
4C090 AA09 BA29 BD31 DA23 DA25
4F070 AA54 AA55 AC40 AC45 AE08
DA22 DA24 DA33 DC16
4J001 DA01 DB01 DB09 EA36 EA37
EB04 EB05 EB06 EB07 EB08
EB23 EB35 EB36 EB37 EB67
EE42B FA03 FB01 FB03
FC01 FD01 GE11 JA20
4J002 AA031 AA051 AA071 AB002
AB031 AB051 AD002 AD011
BH021 CF181 CF191 CL021
CM041 EA026 FD202 FD206
GB04 HA09

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.